

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Kan BK 1-5s rolle i hereditært angioødem bestemmes?

Validering av en LC-MS/MS metode i humant fullblod

Kari Christiane Bjerknes



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

Kan BK 1-5s rolle i hereditært angioødem bestemmes?

Validering av en LC-MS/MS metode i humant fullblod

Kari Christiane Bjerknes

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo

i perioden februar 2011 til mai 2012.

Veiledere:

Professor Leon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Professor Harald Thidemann Johansen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Knut Fredrik Seip, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Professor Erik Waage Nielsen, Nordlandssykehuset, Universitetet i Nordland

Forord

Først og fremst, en stor takk rettes til mine fantastiske veiledere: Leon, Knut Fredrik, Harald og Erik. Takk for all støtte og lærdom som dere har gitt meg, og ikke minst det blide humøret og de interessante samtalerne vi har hatt igjennom året som har gått.

En takk skal også rettes til BRAKUTAN-gruppen på Rikshospitalet, det har vært en glede å samarbeide med dere! Takk til Shire og Sobi for all oppmuntring og støtte dere har vist.

Å utføre masteroppgaven på legemiddelanalyseavdelingen har vært en ren fornøyelse, snillere, morsommere, og dyktige arbeidskollegaer skal man lete lenge etter. Takk til alle på avdelingen for nyttige tips og hjelp under oppgaven, for kaffepauser og sosiale sammenkomster.

Tilslutt må jeg takke mine fabelaktige medstudenter på kontoret. Uten dere ville studiehverdagen vært mye tristere! Takk til farmasijentene og resten av kullet for fem herlige år sammen.

Oslo, mai 2012

Kari Christiane Bjerknes

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Sammendrag	7
Forkortelser	8
1. Innledning	11
1.1 Bakgrunn	11
1.2 Problemstilling	11
2. Teori	12
2.1 Hereditært angioødem	12
2.1.1 Epidemiologi og etiologi	12
2.1.2 Kliniske symptomer og diagnose	13
2.1.3 Behandling	14
2.2 Bradykinin og metabolitten BK 1-5	14
2.2.1 Struktur	14
2.2.2 Biologisk funksjon	15
2.2.3 Biologisk forekomst	15
2.2.4 Metabolisme/stabilitet	17
2.3 Analyse	19
2.3.1 Analyse av Bradykinin	19
2.3.2 Bruk av intern standard	19
2.3.3 Teknikker for prøveopparbeidelse	20
2.3.4 LC-MS/MS	22
2.4 Validering	29
2.4.1 Presisjon og nøyaktighet	29
2.4.2 Linearitet	30
2.4.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	30
2.4.4 Stabilitet	30
2.4.5 Utbytte	31
2.4.6 Matrikseffekter	31
3. Materialer og metoder	32
3.1 Kjemikaler, analytter og utstyr	32

3.1.1	Pasienter og prøvemateriale	34
3.2	Tillaging av løsninger	34
3.2.1	Peptidløsninger	34
3.2.2	Løsninger til bruk ved laboratoriearbeid	36
3.3	Prosedyrer	37
3.3.1	Prøvetaking	37
3.3.2	Prøveopparbeidelse	38
3.4	Analyse	39
3.4.1	LC-MS oppsett og metode	39
3.4.2	LC-MS/MS oppsett og metode	40
3.5	<i>In vitro</i> forsøk av bradykinindannelse	42
3.6	Validering	43
3.6.1	Presisjon og nøyaktighet	44
3.6.2	Linearitet	44
3.6.3	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	45
3.6.4	Stabilitet	45
3.6.5	Utbytte	47
3.6.6	Matrikseffekter	47
3.7	Studiedesign	48
4.	Resultater og diskusjon	50
4.1	Metodeutviklingsdel	50
4.1.1	Mulig inklusjon av BK i LC-MS metoden	50
4.1.2	Innledende forsøk	51
4.1.3	Implementering på lineær ionefelle	52
4.1.4	Bruk av intern standard	55
4.2	<i>In vitro</i> forsøk av bradykinindannelse	55
4.3	Validering	59
4.3.1	Presisjon og nøyaktighet	60
4.3.2	Linearitet	61
4.3.3	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	62
4.3.4	Utbytte	63
4.3.5	Matrikseffekter	64
4.3.6	Stabilitet	65

4.3.7	Oppsummering	68
4.4	Biologiske prøver	68
4.4.1	Normalprøver	68
4.4.2	Pasientprøver	69
4.4.3	Kontroll vs. anfall	74
4.5	Feilkilder/Ettertanker	75
5.	Konklusjon	76
6.	Litteraturliste	77
7.	Vedlegg	80
7.1	Vedlegg 1: Protokoll	80
7.2	Vedlegg 2: Informert samtykkeskjema	85
7.3	Vedlegg 3: REK-godkjenning	93

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å videreutvikle og optimalisere en LC-MS/MS metode for analyse av blodprøver, inaktivert av etanol, inneholdende den relativt stabile metabolitten av bradykinin; BK 1-5. Metoden baserer seg på Seip og Murphys tidligere arbeid [1, 2], og omfatter prøveoppbevaring basert på fast-fase ekstraksjon med C18, kromatografisk separasjon med C8 og daughter ion scan utført på en lineær ionefelle. En klinisk studie utføres i samarbeid med Rikshospitalet, hvor pasienter med arvet angioødem gav blodprøver inneholdende BK 1-5.

Bradykinin ble også implementert i metoden ved fullscan på singelkvadrupol hvor følgende m/z - verdier ble detektert: 354 og 531 m/z . I neste fase ble metoden implementert og optimalisert på en lineær ionefelle. Masseovergangene 287,25 $m/z \rightarrow$ 320,16 og 287,25 $m/z \rightarrow$ 408,26 m/z (BK 1-5), og 354,30 $m/z \rightarrow$ 348,34 m/z (BK) ble valgt. Ved optimaliseringen av metoden ble BK 1-6 brukt som intern standard med følgende masseovergang: 330,80 $m/z \rightarrow$ 555,52 m/z . Ved validering av metoden ble en tung form av BK 1-5, BK 1-5 Heavy labelled, implementert i metoden og brukt som intern standard. Følgende masseovergang ble valgt for BK 1-5 H: 292,17 $m/z \rightarrow$ 408,26 m/z . Det ble bestemt å bruke BK 1-5 som en indirekte markør på BK- genereringen, og BK ble ikke brukt videre.

Metoden ble fullvalidert, hvor blant annet nøyaktighet, intradag og interdag presisjon, linearitet, og utbytte ble undersøkt. Stabiliteten av BK 1-5 ble undersøkt ved romtemperatur i eluat og etanolisk supernatant, ved analyse i autosampler og ved gjentatte frys og tinsykluser. Metoden viser akseptabel nøyaktighet og presisjon, og gir en god linearitet med r^2 verdi $> 0,999$. LOD ble estimert til 66 pg/mL ut i fra kalibreringskurven og LLOQ satt til 150 pg/mL.

Studien mottok 4 pasienter med HAE-anfall, hvorav to av pasientene også gav kontrollprøve noen uker/måneder etter anfallet. Normalprøver fra 6 friske frivillige ble tatt, og sammenlignet med kontrollprøvene fra HAE-pasientene. Pasientprøvene viste mye høyere BK 1-5 nivåer enn hos de friske frivillige, og ved anfall kunne det ses betydelig høyere nivåer av BK 1-5 generert hos pasientene enn ved kontroll.

Forkortelser

Forkortelse	Forklaring
ACE	Angiotensinkonverterende enzym (Angiotensin converting enzyme)
ACN	Acetonitril
Arg	Arginin
BK	Bradykinin
BK 1-5	Bradykinin 1-5
BK 1-5 H	BK 1-5 Heavy labelled
BK 1-6	Bradykinin 1-6
C1 INH	C1 inhibitor
C8	Hydrokarbonkjede med 8 karbonatomer
C18	Hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer
CID	Kollisjonsindusert fragmentering (Collision induced dissociation)
CPN	Plasmakarboxypeptidase N
Da	Dalton
DXS	Dekstransulfat
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EIC	Extracted ion chromatogram
ESI	Elektrosprayionisasjon (electrospray ionization)
Gly	Glysin
HAE	Hereditært angioødem

HCOOH	Maursyre (formic acid)
He	Helium
HMWK	Høymolekylært kininogen, forløperprotein for bradykinin
IS	Intern standard (internal standard)
LC	Væskeskromatografi (liquid chromatography)
LMWK	Lavmolekylært kininogen
LOD	Deteksjonsgrense (Limit of Detection)
LLOQ	Kvantifiseringsgrense (Lower Limit of Quantification)
LPS	lipopolysakkarid
LTQ	Lineær ionefelle (Linear trap quadrupole)
Lys	Lysin
<i>m/z</i>	Masse / ladning
MeOH	Metanol
MS	Massespektroskopi
MS/MS	Tandem MS
NEP	Neutral endopeptidase 24.15
NO	Nitrogenmonoksid
Phe	Fenylalanin
Pro	Prolin
RSD	Relativt standardavvik (relative standard deviation)
SD	Standard avvik (standard deviation)
S/N	Signal-støyforhold (Signal to noise ratio)

Ser	Serin
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Fast-fase ekstraksjon (Solid-phase-extraction)
SRM	Single reaction monitoring
TIC	Total ion count
QC	Kvalitetskontrollprøve (Quality control)

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Hereditært angioødem (HAE) er en arvelig sykdom som beskrives ved plutselige hevelser i hud og slimhinner [3]. Anfallene kan vare i 2-5 dager, og skyldes en genetisk defekt som gir tap av funksjon eller reduserte nivåer av C1- inhibitor (C1 INH), noe som fører til en opphopning av bradykinin (BK). BK er et potent, proinflammatorisk, nonapeptid fra kininfamilien, som ved binding til B2- reseptoren på endotelceller gir økt vaskulær permeabilitet og ødem [4]. Å kunne måle nivået av BK i biologiske prøver er derfor av stor betydning, særlig for diagnose ved angioødem av ukjent årsak. Nylig har en spesifikk BK-antagonist (icatibant) kommet på legemiddelmarkedet, og det er av interesse å undersøke hvor stor betydning BK har ved angioødem anfall hos HAE-pasienter. En klinisk studie er opprettet ved Rikshospitalet og ledes av prosjektleder Linn Landrø (dr. med.), hvor HAE-pasienter kan gi blodprøve ved og utenom anfall.

Utfordringen ved prøvetakning og analyse av BK, er at det brytes hurtig ned. BK nedbrytes og dannes av ulike enzymer i blodbanen, blant annet ACE (angiotensin converting enzyme), og dette er en prosess som også skjer etter prøvetaking. Med en halveringstid på ca 17 sekunder, gjør dette korrekte analyser av BK svært vanskelig. Det dannes i midlertidig en relativt stabil metabolitt av BK på 5 aminosyrer (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe), BK1-5, som indirekte kan brukes som mål på BK- generering. BK 1-5 har en halveringstid på ca 90 minutter, noe som gjør at måling av dette peptidet gir en mer robust gjenspeiling av BK- generering enn måling på BK direkte [5].

1.2 Problemstilling

Målet med denne oppgaven var å videreutvikle og optimalisere en LC-MS/MS metode basert på Murphy og Seips arbeid[1, 2], og deretter fullvalidere metoden. Denne metoden skal brukes til å bestemme BK 1-5 i blodprøver fra HAE- pasienter ved og utenom anfall.

2. Teori

2.1 Hereditært angioødem

2.1.1 Epidemiologi og etiologi

HAE er en arvelig autosomal dominant sykdom som rammer 1 av 50 000 mennesker, og i Norge er det rapportert omlag 100 tilfeller av denne sykdommen [6, 7]. Sykdommen skyldes en genetisk defekt som gir tap av eller reduserte nivåer av C1 INH. Dette fører til en ukontrollert dannelse av peptidet BK som anses å være den viktigste mediatoren ved HAE.

HAE inndeles i 2 hovedtyper. Type 1 mutasjoner (85 % av HAE- pasientene), resulterer i ødelagt proteinsyntese av C1 INH, og gir lave nivåer av C1 INH i blodet (<50 % av normalt). Type 2 mutasjoner (15 % av pasientene), skyldes som regel en punktmutasjon nær det aktive setet på proteinet, og dette gir produksjon av et dysfunksjonelt protein [8, 9]. Det er dokumentert over 100 mutasjoner av C1 INH genet, også kalt SERPING1. Omtrent 25 % av disse mutasjonene oppstår spontant, og er funnet hos pasienter uten familiehistorie av HAE [10, 11].

C1 INH er en proteasehemmer og hovedregulatoren av komplementsystemet, samt delaktig i kontaktaktiveringssystemet. Med en defekt C1 INH vil det kunne dannes ukontrollerte mengder BK, som kan lede til økt vaskulær permeabilitet og ødem [12]. BKs funksjon er beskrevet under punkt 2.2.2.

2.1.2 Kliniske symptomer og diagnose

HAE er karakterisert ved anfall av ikke-kløende, non-urtikarielle hevelser i hud og slimhinner, vanligvis i hender, føtter, mage/tarmkanalen og ansiktet. Anfall i hender og føtter er ikke farlig, men kan oppleves som ubehagelig. Ved anfall i magen kan dette føre til magesmerter, og starten av anfallet er ofte assosiert med kvalme og oppkast [13, 14]. Anfall i luftveiene kan være livstruende, da dette kan lede til luftveisobstruksjon. Figur 2-1 viser mor og datter med HAE- anfall i



Figur 2-1. Til venstre: Barn med HAE-anfall i ansikt. Til høyre: Kvinne med HAE-anfall i ansikt.

ansikt. Det er estimert at halvparten av HAE-pasientene vil oppleve et anfall i luftveiene i løpet av livet [13]. Kjente anfallstriggere er stress, fysisk belastning (spesielt statisk belastning (f.eks. å skrive på PC)), trauma (f.eks. tannbehandling), infeksjoner, hormoner (pubertet, graviditet) og legemidler (østrogenholdige legemidler og ACE-hemmere) [3].

Anfallslengden og hyppigheten av anfallene varierer svært blant pasientene. Hevelsene utvikler seg sakte i løpet av 12-36 timer og kan vare i 2-5 dager uten behandling [14]. På bakgrunn av de spontane anfallene og varigheten av hvert anfall, blir livskvaliteten til pasientene redusert.

Diagnose av sykdommen skjer oftest i løpet av pasientens andre tiår, da anfallene ofte blir hyppigere og mer markante [8]. For å diagnostisere HAE bestemmes først C4 nivået i serum hos pasienten. C4 er en komplementfaktor i blodet, som nedsettes ved HAE. Et nivået av C4 lavere enn 30 % av normalen, tyder dette på HAE. C1 INH defekten bekreftes ved å måle aktiviteten og mengden av C1 esterase i plasma. C1 esterase er substratet som C1 INH hemmer, og for både type 1 og 2 vil denne aktiviteten være under 50 % av normalen [13, 14].

2.1.3 Behandling

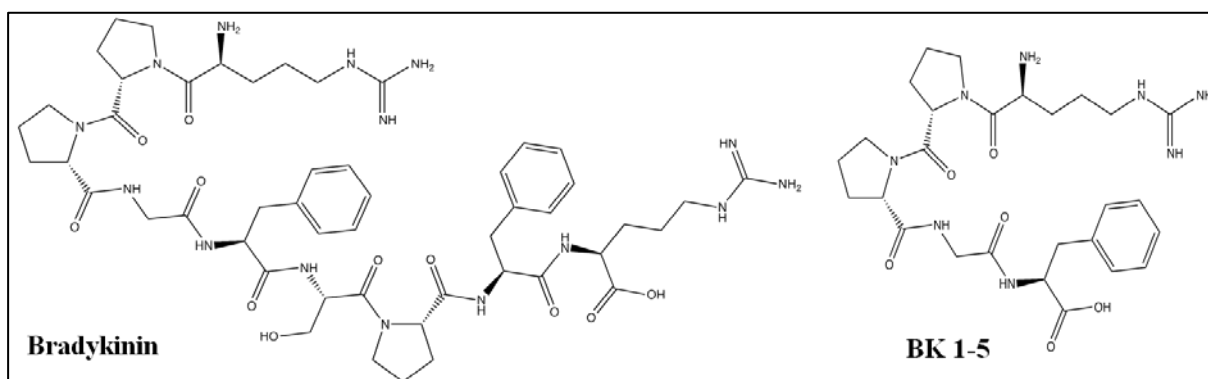
Det har lenge vært mangel på legemidler for HAE pasienter. Fra 1960-tallet ble det vanlig å behandle forebyggende med androgener (primært Danazol[®]), da disse øker syntesen av C1-INH fra leveren [14]. Ulempen med androgenene er at legemidlene ikke stopper et anfall, da det tar 1-2 dager før de oppnår sin effekt i leveren. Da C1 INH isolert fra humant plasma kom på markedet i Europa, endret dette praksisen ved medisinerings av HAE-anfall. Den kliniske studien I.M.P.A.C.T.2 viste at C1 inhibatoren Berinert[®] ga symptomlettelse innen 0,46 timer (mediantid) ved dosering av 20 E/kg kroppsvekt [15], og full symptomfrihet etter 15,5 timer.

I 2008 kom et nytt legemiddel på markedet for HAE pasienter med anfall: bradykininantagonisten Icatibant (Firazyr[®]). Icatibant er en kompetitiv antagonist med høy selektivitet for bradykinins B2-reseptor [16]. Legemidlet gis subkutant, fortrinnsvis i mageregionen, og gir symptomlettelse etter 2 timer (mediantid) ved subkutant eller abdominalt anfall [17].

2.2 Bradykinin og metabolitten BK 1-5

2.2.1 Struktur

BK er et nonapeptid som dannes ved spalting av høymolekylært kininogen (HMWK), og har aminosyresekvensen Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (se figur 2-2) [4]. BK har en molekylmasse på 1060,21 Da.



Figur 2-2. Struktur av bradykinin (til venstre) og metabolitten BK 1-5 (til høyre).

Metabolitten BK 1-5 blir enzymatisk spaltet fra BK, og har aminosyresekvensen Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (se figur 2-2) [1]. BK 1-5 har en molekylmasse på 572,3 Da (monoisotopmasse), som gir et MS- signal på 287 m/z ($M + 2H$)²⁺.

2.2.2 Biologisk funksjon

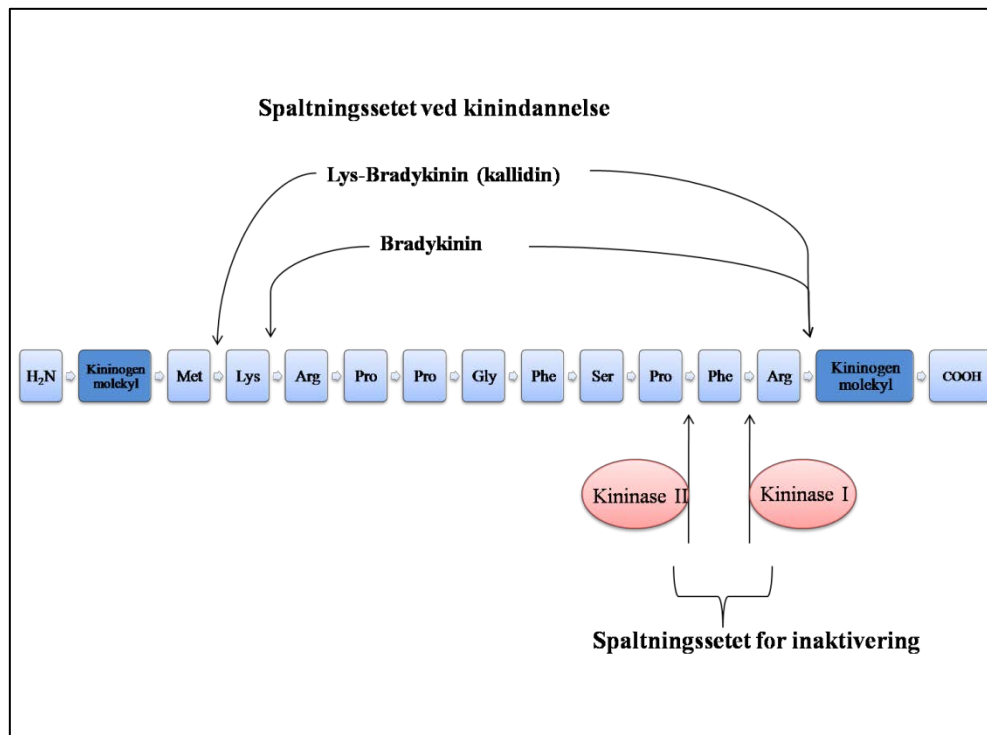
BK er en potent vasodilator og bidrar til økt vaskulær permeabilitet [18]. Den biologiske effekten utøves ved å stimulere 2 ulike reseptorer, B1 og B2. B2-reseptoren er konstitutivt uttrykt i de fleste vev og aktiveres av BK. Videre signalisering fra B2-reseptoren gir generering av inflammatoriske mediatorer som nitrogenmonoksid (NO) og prostaglandinet PGI₂, som også er potente vasodilatorer. B1-reseptoren er normalt til stede i lave konsentrasjoner, men vil oppreguleres ved inflammasjon eller ødelagt vev. Liganden til B1-reseptoren er des-Arg⁹-bradykinin.

Ved økt vaskulær permeabilitet skjer det lekkasje av væske, proteiner og immunceller ut i vevet, og ødem oppstår.

2.2.3 Biologisk forekomst

Dannelsen av bradykinin *in vivo* i blodet skjer via kontaktaktiveringssystemet. Andre systemer er også involvert under HAE- anfall, f.eks. komplementsystemet. Komplementsystemet er et system med proteiner som spiller en stor rolle under inflammasjonsprosessen, blant annet ved å øke vaskulær permeabilitet.

Kontaktaktiveringssystemet består av kininogen, faktor XII og prekallikrein. Kininogen er et α -globulin som finnes i to ulike former, høymolekylær (MW = 110 000) og lavmolekylær form (MW = 70 000). Spalting av HMWK av serinproteasen plasmakallikrein frigir BK (se figur 2-3) [18].



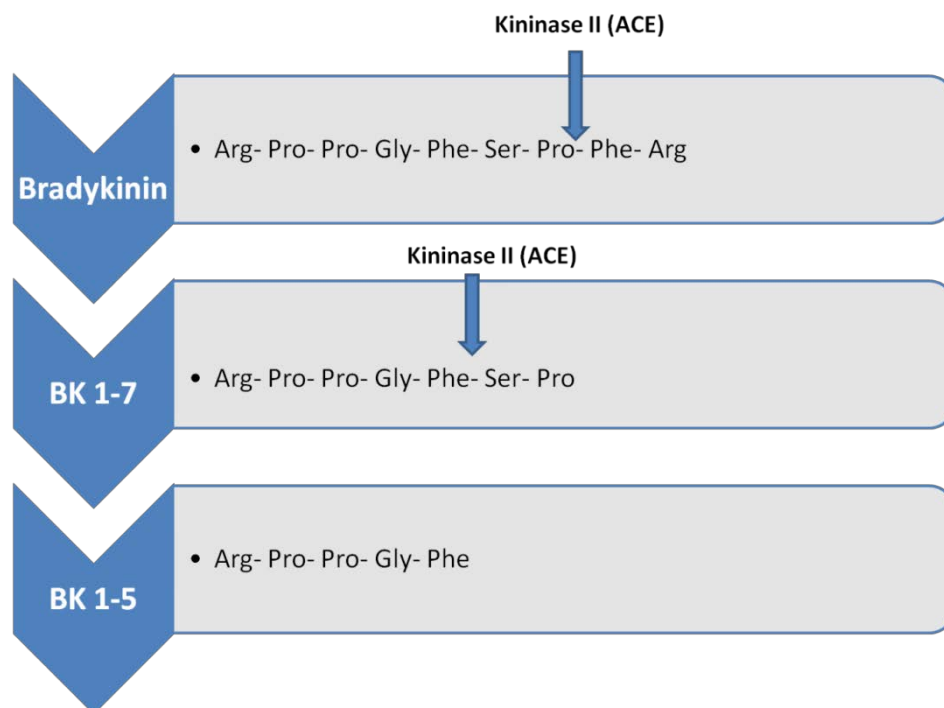
Figur 2-3. HMWK med spaltningssitet hvor plasmakallikrein spalter HMWK til bradykinin [19]. Viser også hvor enzymene kininase I og II inaktiverer BK.

Figur 2-4 viser hvordan BK genereres. Faktor XII autoaktiveres ved kontakt med negativt ladde overflater til faktor XIIa. *In vivo* kan dette være overflater som kollagen, bakterielle lipopolysakkarider (LPS), eller urinsyrekrystaller. *In vitro* studier har vist at negative ladde overflater som glass og dektransulfat også aktiverer kontaktaktiveringskaskaden. Aktiv FXIIa spalter så prekallikrein til kallikrein, som selv spalter HMWK til BK [20].

Plasmakallikrein aktiveres når faktor XIIa spalter prekallikrein til aktiv plasmakallikrein. I tillegg til plasmakallikrein, finnes det også vevskallikrein, som utskilles av celler fra blant annet lungene, nyrene, og hjernen [20]. Vevskallikrein spalter lavmolekylært kininogen, som gir Lys-bradykinin. Lys-bradykinin spaltes så av aminopeptidaser og gir BK.

svært fort, med en rapportert halveringstid på 17 sekunder i katt [23]. Det meste av BK blir metabolisert i lungene, da konsentrasjonen av kininase II er svært høy her. Kininase II er bedre kjent som angiotensinkonverterende enzym (ACE).

Kininasene deles inn i to grupper, exopeptidaser og endopeptidaser [22]. Exopeptidaser spalter peptider ved N- eller C- terminal enden, mens endopeptidasene spalter interne peptidbånd. Kininase I er en exopeptidase og kalles også plasmakarboxypeptidase N (CPN). Kininase I fjerner aminosyren Arg ved C- terminalenden til BK og gir des-Arg⁹-bradykinin. Kininase II, også kalt ACE, spalter av to aminosyrer fra C-terminalen til BK, resulterende i heptapeptidet BK 1-7. Dette heptapeptidet blir så spaltet igjen av kininase II, og gir pentapeptidet Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (BK1-5) (se figur 2-6) [20]. BK 1-5 er en relativt stabil metabolitt av BK, med en halveringstid på ca 90 minutter [5]. Eksempler på enzymer som er endopeptidaser, som spalter BK's interne aminosyrebindinger, er blant annet neutral endopeptidase 24.15 (NEP) og prolyl endopeptidase [22].



Figur 2-6. Enzymatisk degradering av bradykinin via kininase II (ACE).

2.3 Analyse

2.3.1 Analyse av Bradykinin

Som beskrevet før har BK en halveringstid på ca 17 sekunder, noe som gjør korrekte analyser av BK svært vanskelig. Det dannes i midlertidig en relativt stabil metabolitt av BK på 5 aminosyrer, BK1-5, som indirekte kan brukes som mål på BK generering. BK 1-5 har en halveringstid på ca 90 minutter, noe som gjør analyse av BK 1-5 mer robust enn måling på BK direkte [5]. I tillegg vil vaskulært trauma og negativt ladde overflater (i for eksempel glasset i blodprøvebeholderne), bidra til aktivering av kininsystemet og gi kunstig produksjon av BK, noe som i sin tur kan gi økt BK 1-5 dannelse. Denne kontaktaktiveringsprosessen er stoppet ved å overføre blodet direkte over i iskald etanol innen 60 sekunder, slik Murphy viste i 2000 [1].

2.3.2 Bruk av intern standard

Ved bruk av omfattende prøveopparbeidelsesteknikker, er det ønskelig å bruke en intern standard (IS) [24]. En intern standard er et stoff som tilsettes prøven i kjent mengde før prøveopparbeidelsen starter, og vil korrigere for eventuelle endringer som skjer under prøveopparbeidelsen. En forutsetning for dette er at den interne standarden oppfører seg mest mulig likt som stoffet som skal analyseres. En god intern standard vil:

- Oppføre seg som analytten under prøveopparbeidelsen
- Være strukturmessig lik analytten og har en detektorrespons som analytten
- Separeres fra andre stoffer i prøven

Metoden som er optimalisert hadde BK 1-6 som intern standard i starten. BK 1-6 er svært lik BK 1-5, med kun en serinaminosyre på C-terminalen som utgjør forskjellen. Dette gjør BK 1-6 noe mer polar, og man kan kromatografisk skille BK 1-5 og BK 1-6 [2].

Ved bruk av massespektroskopi som deteksjonsmetode vil den ideelle internstandard være en tung form av analytten som koeluerer med analytten, men som skilles fra hverandre i MS på grunn av forskjell i masse. En isotopmerket intern standard er en forbindelse som er strukturmessig lik analytten, men som har byttet ut en eller flere atomer med sin tyngre

isotop. Bytting av (^1H) til deuterium (^2D) er et eksempel på dette. Deuterium er en masseenhet høyere enn hydrogen, og en deuterert intern standard vil derfor være tyngre enn analytten. Den deutererte internstandarden vil oppføre seg kromatografisk likt som analytten, men man kan skille dem fra hverandre ved massespektroskopi. Internstandarden som er brukt i oppgaven er BK 1-5 Heavy labelled, som har en isotopanalogue av aminosyren Phe. Ved å bruke en isotopanalogue som er 10 dalton tyngre enn analytten, får analytten og internstandarden ulike MS- spektra.

2.3.3 Teknikker for prøveoppbehandling

Fullblod er en kompleks matris som består av blant annet blodceller, proteiner (albumin og globulin), fettstoffer og salter som natrium-, kalium-, kalsium- og magnesiumklorid [25]. Dette er stoffer som blant annet kan tette den kromatografiske kolonnen ved analyse, og det er derfor viktig med en god prøveoppbehandling før analyse. Finnes det også stoffer i blodet som er uforenlig med mobilfasen, kan disse felle ut og tette blant annet injektoren og kolonnen i analysesystemet. I tillegg er BK og BK 1-5 normalt til stede i svært lave konsentrasjoner i blodet, og det er nødvendig med en oppkonsentrering av prøven. I følgende avsnitt diskuteres prøvetaking og fast-fase ekstraksjon.

Prøvetaking

Prøvetakingen er basert på Murphys og Seips tidligere arbeid [1, 2]. For å oppnå korrekte og robuste analyser av BK og metabolitten, er det viktig med effektiv prøvetaking. For å hindre BKs *ex vivo* generering og nedbrytning av ulike enzymer i blodet ved prøvetaking, overføres blodet direkte til iskald etanol etter tapping. Murphy viste at BK 1-5 konsentrasjonen i en blodprøve var uendret inntil 60 sekunder etter prøvetaking [1], og det er derfor viktig at blodet overføres *umiddelbart* til etanolen. Etanolen fungerer i dette tilfellet som et proteinfellingsreagens som stopper enzymaktivitet.

Fast-fase ekstraksjon

For å rense, isolere og oppkonsentrere prøvene, benyttes fast-fase ekstraksjon (SPE) basert på omvendt-fase-prinsippet i oppgaven. SPE er en prøveoppbehandlingsteknikk hvor prøveløsningen suges gjennom en sorbent (SPE-kolonne), og retarderes på sorbenten. I denne oppgaven ble det brukt en C18 sorbent med 100 mg pakkemateriale.

Ekstraksjonsprosessen utføres normalt over flere trinn; kondisjonering, prøvepåsetting, vask og eluering av analytten (se figur 2-7).

Kondisjonering

For at analytten skal retarderes på sorbenten, er det viktig å fukte pakkematerialet først. Dette kalles kondisjonering og innebærer å aktivere sorbenten med organisk modifikator (ved omvendt-fase SPE) slik at den er klar for å ta imot prøven. Sorbenten består av C18 kjeder som før kondisjonering ligger tett og flatt i sorbenten. Kondisjoneringen reiser de funksjonelle gruppene, øker det aktive overflatearealet og sikrer at prøveløsningen får god kontakt med den aktive overflaten [24]. Det er viktig å vaske ut den organiske modifikatoren etter kondisjonering, da denne kan interferere med retensjonen av analytten. Dette gjøres med en vandig løsning helst tilsatt en buffer, og sorbenten blir da klar for prøveløsningen.

Prøvepåsetting

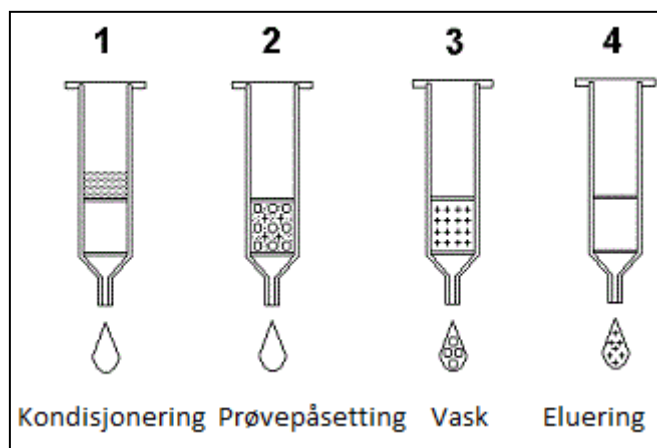
Prøveløsningen suges gjennom kolonnen ved hjelp av vakuum, og stoffene vil retarderes på kolonnen. I omvendt-fase- SPE vil analytten og forurensinger retarderes ved Van der Waals krefter, hovedsakelig hydrofobe interaksjoner [24].

Vask

Det er ikke bare analytten som retarderes på sorbenten ved prøvepåsetting. De polare forurensningene i prøven vaskes ut med en vaskeløsning som bryter interaksjonen forurensing-sorbent, men ikke interaksjonene mellom analytt og sorbent. Det er viktig å ikke bruke så høy løsemiddelstyrke til vaskingen, da dette kan skylle ut analytten i tillegg.

Eluering

Det er ønskelig å eluere ut analytten i et så selektivt og lite volum av elueringsmiddel som mulig; dette for å unngå unødvendig fortynning og forurensinger. Elueringsmiddelet som brukes skal bryte analytt-sorbent interaksjonene, men må ikke være så sterkt at det bryter interaksjoner sorbenten har med upolare forurensninger som er sterkere bundet enn analytten.



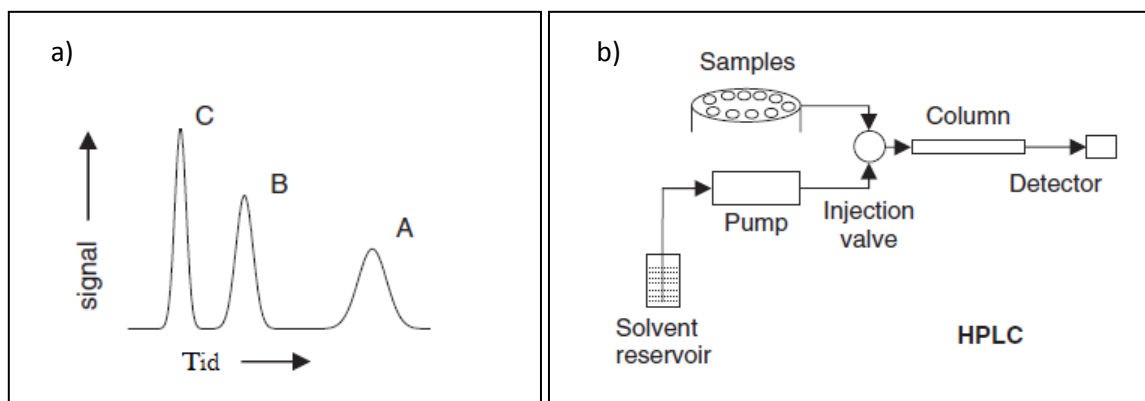
Figur 2-7. Ekstraksjonsprosessen ved omvendt-fase SPE. 1. Kondisjonering. 2. Prøvepåsetting. 3. Vask. 4. Eluering av analytten.

2.3.4 LC-MS/MS

2.3.4.1 Væskekromatografi (separasjon)

Væskekromatografi er et samle navn på ulike separasjonsmetoder som benyttes til å skille stoffer fra hverandre [24]. Separasjonsmetoden startet allerede på tidlig 1900-tallet med teknikken "classical coloumn chromatography", hvor en fylte et glassrør med et lett pulver (for eksempel kalk), plasserte prøven på toppen av glassrøret, og skylte prøven igjennom røret med væske. De ulike komponentene i prøven ble separert av kalken, og forskerne kunne samle/måle komponentene ut i fra tiden de brukte igjennom glassrøret [26].

Dagens væskekromatografi baserer seg på samme prinsipp; med en kolonne pakket med partikler (stasjonærfase) og en fase som beveger seg gjennom kolonnen (mobilfase). Når en prøveløsning med ulike komponenter injiseres på kolonnen, vil stasjonærfasen bremse opp (retardere) stoffene med forskjellig styrke. Stoffene bruker dermed ulik tid igjennom kolonnen, og stoffene separeres. Dette vises i et kromatogram med en topp for hvert stoff (se figur 2-8a). Væskekromatografi utføres ved hjelp av HPLC, som normalt består av mobilfaseresevoir, pumpe (kontrollerer mobilfasehastigheten og genererer nok trykk til å drive mobilfasen igjennom kolonnen), en injektor (som injiserer prøveløsningen på kolonnen), kolonnen (hvor separasjonen foregår), og en detektor (som detekterer stoffene) (se figur 2-8b).



Figur 2-8. a) Kromatogrammet viser tre ulike stoffer (stoff A, B og C) som retarderes ulikt på kolonnen. b) Typisk apparatur-oppsett til HPLC [26].

Omvendt-fase-kromatografi

Omvendt-fase-kromatografi er det mest brukte separasjonsprinsippet, på grunn av den utstrakte bruken av vandige prøveløsninger [24]. Dette er et separasjonsprinsipp hvor man har en upolar (hydrofob) kolonne som kombineres med en (polar) blanding av vann og organisk modifikator som mobilfase. Den hydrofobe stasjonærfasen er normalt en silikabasert fase, og består av sidekjeder med ulik hydrofobisitet, som oftest hydrokarbonkjeder av ulik lengde. Anbefalt pH-område for silikabaserte stasjonærfaser er pH mellom 2-8, da silika løses opp i pH høyere enn 8, og ved pH lavere enn 2 kan de funksjonelle gruppene spaltes av [2, 24].

Stoffer retarderes ved hydrofobe interaksjoner [26]. Polare stoffer trives i mobilfasen og føres igjennom kolonnen i takt med mobilfasehastigheten. Stoffer av mer upolar karakter binder seg til den upolare stasjonærfasen ved hydrofobe interaksjoner og retarderes i kolonnen.

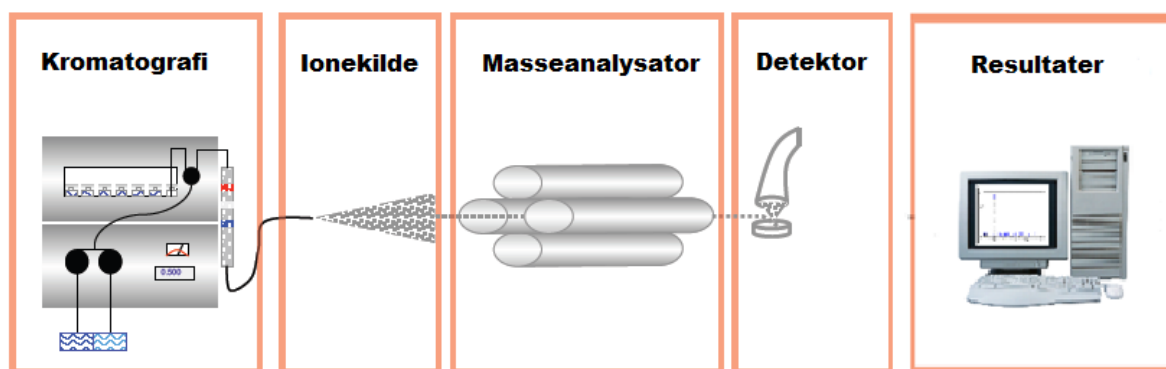
For prøver med analytter med lang retensjonstid eller med stor forskjell i retensjon, er det ønskelig å bruke gradienteluering ved analyse. Ved bruk av gradienteluering økes mengden av organisk modifikator i mobilfasen over tid, slik at de hydrofobiske interaksjonene brytes raskere og analytten elueres ut tidligere [26].

2.3.4.2 Massespektroskopi (Deteksjon)

Massespektroskopi er en analyseteknikk som utføres ved hjelp av et massespektrometer [24]. Massespektrometeret kan kobles til ulike separasjonsmetoder; blant annet GC, LC, og CE, og sammen utføre kvantitative analyser og identifikasjon. Det vil fokuseres på LC-MS i denne delen, da det var dette som ble brukt i oppgaven.

Massespektroskopi koblet til væskechromatografi (LC-MS) er en utstrakt analysemetode, men det har ikke alltid vært slik. Da væskechromatografi ble koblet til massespektroskopi på 80-tallet, var utfordringen å innføre prøveløsningen inn i vakuum. Flere ulike "overganger" ble produsert, men det var først da atmosfæretrykk ionisering (API) ble introdusert på 90-tallet at LC-MS virkelig ble en suksess [27]. API fører til dannelse av frie ioner som føres inn i MSen. LC-MS brukes nå mye i farmasøytisk industri, ved kliniske analyser, og karakterisering av peptider og proteiner [28]. Det er den høye sensitiviteten og selektiviteten i forhold til andre analysemetoder, som gir LC-MS en stor fordel ved analyser med biologiske prøvematerialer.

Ved elektroprayionisering, som er en type API, vil ioner dannet i mobilfasebuffer føres inn i ionekilden hvor de tilføres en gass og et elektrisk potensial. Dette fører til dannelse av frie molekyllioner, som enten er positive ioner (positive mode) eller negative ioner (negative mode). Etter ionisering vil molekyllionene separeres i en masseanalysator, hvor analysatoren separerer ionene etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z) (forkortes m/z). Ionene detekteres etter analysatoren ved hjelp av en detektor, som registrerer mengden av ioner som dannes og hvilke masser disse ionene har [24]. Resultatene kan ses i et massespektrometer, hvor intensiteten (mengden) av ioner plottes i et stolpediagram som funksjon av m/z . Se figur 2-9 for skjematisk oversikt av prinsippet ved massespektroskopi.



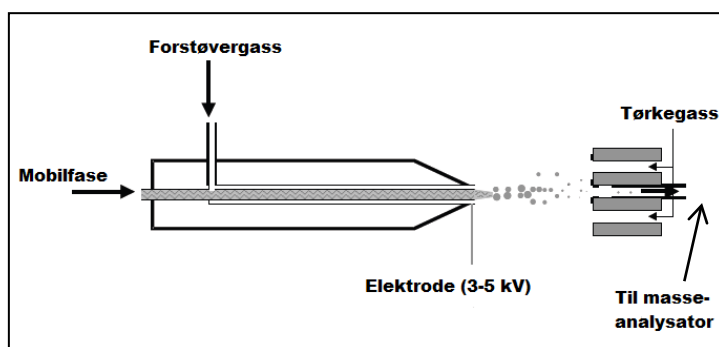
Figur 2-9. Skjematisk oversikt over prinsipp av massespektroskopi.

Elektroprayionisering (ESI)

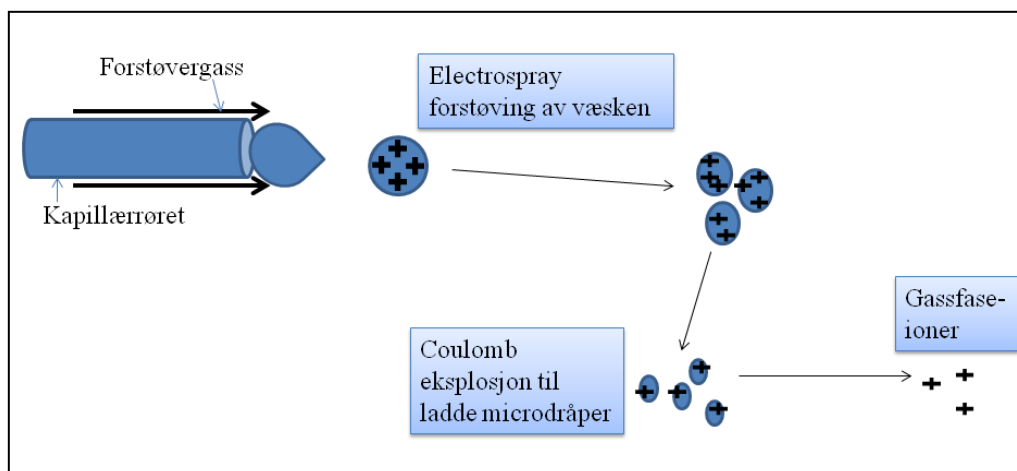
Det finnes mange ulike ioniseringsteknikker for massespektroskopi, hvor elektroprayionisering er den viktigste ved LC-MS-analyser av biologiske materialer. Elektroprayionisering er en myk ioniseringsteknikk, det vil si at det er ingen eller lite fragmentering som oppstår i ionekilden. ESI er en god teknikk for polare forbindelser, som

peptider, og bringer molekyler fra væske over i gassfase. ESI kan produsere ioner med flere ladninger, avhengig av strukturen til molekylet. Basiske molekyler i løsninger med lav pH gir positive ioner (positive mode), mens sure molekyler i løsninger med høy pH gir negative ioner (negative mode). I denne oppgaven analyseres molekyler som gir positive ioner, og analysene kjøres derfor i positive mode.

Den generelle fremgangsmåten ved ESI er: mobilfase fra HPLC systemet passerer gjennom et trangt kapillærrør, enten laget av rustfritt stål eller fused-silica. Rundt kapillæret tilføres forstøvergass (se figur 2-10), som kommer i kontakt med væskestrømmen ved utgangen til kapillæret. Her forstøves væsken ved hjelp av gass (vanligvis nitrogen), og et elektrisk potensial på 3-5 kV tilsatt kapillæret, til dråper. Avhengig av hva slags polaritet det elektriske potensialet har, kan en bestemme hvilke ioner som dannes (positive mode eller negative mode). Videre reduseres dråpene til små, ladde dråper, som vil eksplodere på grunn av høy overflatespenning. Denne eksplosjonen kalles Coulomb explosion [28], og gir høyladde mikrodåper som vil fordampe til gassfase-ioner (se figur 2-11). Disse gassfase-ionene føres inn i vakuum og videre til masseanalysatoren. For å få en jevn strøm av ioner inn i vakuumdelen av massespektrometeret, tilsettes en tørkegass ved inngangen til massespektrometeret (se figur 2-10). Tørkegassen er ofte nitrogen, og sørger for at ionene ikke "klumpes" sammen (kalt declustering) [29]. Ionene føres inn til masseanalysatoren ved hjelp av skimmere og linser, og føres gradvis fra atmosfæres trykk til vakuum [29].



Figur 2-10. Oversikt over ionekilden, ESI [30].

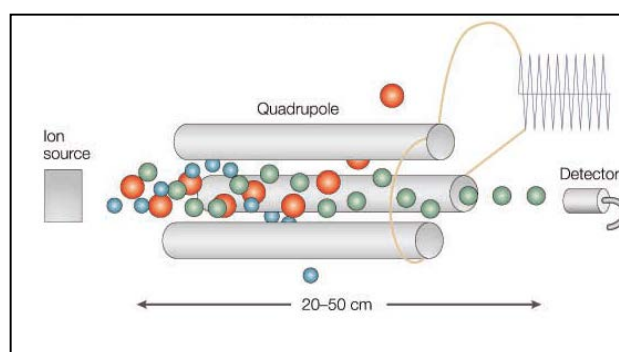


Figur 2-11. Handlingssekvensen som leder til gassfase-ioner i elektrosprøyen [28].

For å optimalisere elektrosprøyioniseringen er det viktig å tenke på blant annet følgende parametere; pH i løsningen, valg av løsninger, og hastigheten til mobilfasen. Ved å velge en pH i løsningen som favoriserer ionisering av analyttene, og samtidig ha lav flow på mobilfasen, blir det lettere for analyttene å bli frie ioner i ioniseringskammeret. For å justere pH i løsningen brukes buffere som kun inneholder flyktige salter. Salter som ikke er flyktige (for eksempel natrium-salter) kan skitne til MS-systemet på grunn av utfelling. Det er også viktig at løsningene som brukes går lett over i gassfase, og løsninger som metanol og acetonitril er godt egnet ved ESI [31].

Masseanalysator: Single quadrupol (SQ)

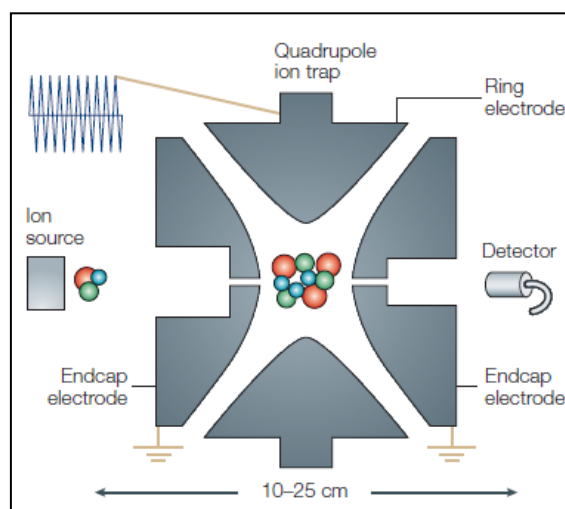
Singel kvadrupol masseanalysator er en "enkel" masseanalysator. Prinsippet er at det brukes et elektrisk felt til å separere ionene i forhold til deres masse-til-ladning forhold (m/z) mens ionene beveger seg langs 4 parallelle metallsylindere som har konstant spenning og skiftende frekvens. Avhengig av spenningen og frekvensen vil ioner med forskjellig masse kunne passere gjennom kvadrupolen og registreres av detektoren (se figur 2-12) [24].



Figur 2-12. Kvadrupol masseanalysator [32]. Den øverste metallsylinderen er ikke vist.

Masseanalysator: Ionefelle

En ione-felle er konstruert av en ringelektrode og to end-cap elektroder (se figur 2-13). Ionene fanges i fellen ved et radially todimensjonalt radio frekvens (RF) felt (ringelektroden), og et aksialt felt ved likestrøm tilsatt end-capene. Samtidig vil heliumgass til stede i ione-fellen redusere den kinetiske energien til ionene og fange de inne i fellen. Ionene fanges i 1-30 ms, og beveger seg i en slags 8-tallsbane; kalt Lissajousbane [33]. Ved å øke RF potensialet vil ionenes baner bli mer ustabile og de vil forsvinne ut av ione-fellen gjennom den ene end-cap elektroden og deretter detekteres. Ut i fra RF frekvensen og likestrømfeltet vil man kunne velge hvilke ioner med spesifikke m/z - verdier som skal ut av fellen og hvilke som fanges lengre. Ionene med lavest m/z verdi forsvinner først, og økende m/z verdier forsvinner med økende RF potensial. Ved fragmentering vil energi tilføres og heliumgassen vil virke som en kollisjonsaktivator; ionene i fellen vil kollideres med heliumatomer og øker sin indre kinetiske energi. Til slutt vil ionene fragmentere på grunn av ustabilitet forårsaket av høy kinetisk energi og kollisjoner. I denne oppgaven er det brukt en lineær ione-felle, som er basert på samme prinsipp som omtalt ovenfor. Forskjellen er at kammeret er formet som en kvadrupol ved den lineære ione-fellen, noe som gjør det mulig å fylle ione-fellen med flere ioner.



Figur 2-13. Skjematisk bilde av en ione-felle [32].

Tandem MS

Fragmentering er en prosess hvor ionene som føres inn i masseanalysatoren brytes ned til mindre deler. Prosessen kalles også MS/MS fragmentering, og brukes for å få strukturinformasjon eller bedre selektiviteten og sensitiviteten ved kvantitative analyser. Det

spesifikke ionet som skal fragmenteres, kalt "parent ion", isoleres i ionefellen ved å destabilisere alle andre ioner. Det gjør at etter denne prosessen vil kun parent ionet og heliumgass vil være til stede i ionefellen. I neste trinn gjør spenningsendringer at ionet vil begynne å bevege seg fort gjennom ionefellen og kolliderer med gassmolekyler. Dette fører til kollisjonsindusert fragmentering eller collision induced dissociation (CID). De mindre fragmentene er kalt "product ions" og registreres så av detektoren [27]. Ionefellen har muligheten til å gjenta en slik MS/MS fragmentering, og dette kalles et MSⁿ eksperiment, hvor n er lik antall MS-fragmenteringer.

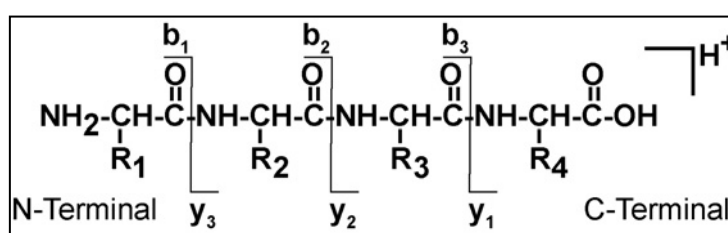
Monitoreringsprinsipper

Det finnes ulike monitoreringsprinsipper ved single MS og tandem MS, og det vil her bli kort fortalt de prinsippene som er brukt i oppgaven:

- Fullscan: I fullscan mode vil ionefellen fange alle ionene i fellen, og deretter slippe ut ionene i forhold til deres m/z verdier. Alle ionene i ionefellen detekteres. Det samme prinsippet gjelder for SQ, men disse vil ikke fanges i kvadrupolen, kun føres igjennom metallsyklinderne, og ionene detekteres etter kvadrupolen.
- Det ble kjørt SIM mode (Selected Ion Monitoring) på singel kvadrupolen. Ved SIM vil kun m/z verdier fra ionet av interesse få passere gjennom kvadrupolen, mens alle uønskede ioner forsvinner ut. Siden det kun velges ut ett eller få ioner som skal monitoreres, vil man kunne oppnå lave deteksjonsgrenser og høyere sensitivitet enn ved fullscan eksperimenter.
- Selected Reaction Monitoring: Parent ion (med spesifikk m/z -verdi) velges ved første MS-trinn, ionet isoleres og fragmenteres, og kun valgte fragmenter detekteres i andre MS-trinn. På denne måten vil man oppnå svært sensitive analyser, da begge MS-trinnene kun analyserer på valgte m/z -verdier.
- Daughter ion scan med extracted ion chromatogram (EIC): I første MS-trinn isoleres ønsket ion med spesifikk m/z verdi. Deretter fragmenteres ionene i kollisjonscellen, før alle fragmentene slippes ut og monitoreres i andre MS-trinn (full scan). Etter endt analyse brukes softwarefunksjonen EIC, hvor ønskede fragmenter med masseoverganger ekstraheres ut av TIC'en (det totale antallet ioner som er detektert).

Fragmentering av peptider

Ved fragmentering i andre MS- trinn fragmenteres peptider vanligvis etter et bestemt mønster [33]. Peptider består av en rekke aminosyrer, med en C-terminal ende og en N-terminal ende. Ved fragmentering vil peptidet deles i to ulike deler, enten med C-terminalen intakt, eller med N-terminalen intakt. Fragmenter som inneholder C-terminal enden kalles y – fragmenter, og nummereres fra C-enden. Fragmenter som inneholder N- terminal enden kalles b- fragmenter og nummereres fra N- enden (se figur 2-14) [33]. Fragmenteringsmønsteret kan brukes til identifikasjon av peptider og bestemmelse av molekylstruktur til ukjente stoffer.



Figur 2-14. Generell nomenklatur av b- og y- fragmenter.

2.4 Validering

Ved bruk av bioanalytiske metoder er det viktig at resultatene er reproduserbare og pålitelige. Det er derfor nødvendig å bruke en validert metode, eller validere metoden selv. Når en ny bioanalytisk metode utvikles eller implementeres for første gang, vil man fullvalidere metoden. Hovedmålet med fullvalidering er å demonstrere påliteligheten av metoden som brukes for bestemmelse av analyttkonsentrasjon i et bestemt biologisk materiale [34]. En kort beskrivelse av ulike parametere som inngår i valideringen følger her.

2.4.1 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon er spredning av analyseresultatene, og beskriver hvor nært et antall enkeltanalyser kommer hverandre. Presisjonen blir målt ved å estimere relativt standardavvik (RSD) for prøvene. Presisjonen måles på to ulike nivåer; intradag som beskriver repeterbarheten innenfor én dag og interdag som beskriver intermediær presisjon av metoden målt på 5 ulike dager. Presisjonen for hvert konsentrasjonsnivå skal ikke overstige 15 % relativt standardavvik, bortsett fra ved kvantifiseringsgrensen så skal presisjonen ikke overstige 20 % relativt standardavvik.

Nøyaktighet er avvik fra sann verdi, og det beskriver hvor nært gjennomsnittresultatet er fra sann verdi [24]. Nøyaktigheten for metoden beregnes for å forsikre at det ikke er systematiske feil ved metoden. FDAs krav er satt til 20 % innenfor sann verdi ved deteksjonsgrensen, mens øvrige konsentrasjonsnivåer må være innenfor 15 % av sann verdi [35].

2.4.2 Linearitet

Linearitet er egenskapen metoden har til å gi standardkurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjon innenfor et gitt konsentrasjonsområde [24]. Regresjonslinjen estimeres og regresjonskoeffisienten (r^2) oppgis. Regresjonskoeffisienten bør ha en verdi på 0,999, men kan ha lavere verdier avhengig av hva metoden skal brukes til.

2.4.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD, *limit of detection*) angir den laveste konsentrasjon av stoff som med sikkerhet kan detekteres i prøven med den aktuelle analysemetoden [24]. Det er svært lave konsentrasjoner som kan detekteres ved LC-MS, på grunn av MS-systemets høye selektivitet. For å estimere deteksjonsgrensen beregnes intensitetsforholdet mellom topphøyde til analytten og høyden til bakgrunnsstøyen (S/N). Ofte settes kravet $S/N = 3$.

Kvantifiseringsgrensen (LLOQ, *lower limit of quantification*) defineres som den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon og nøyaktighet [24]. For å finne LLOQ beregnes S/N, slik som ved LOD, men kravet til LLOQ settes til 10. LLOQ kan ikke være lavere enn nederste punkt som valideres.

2.4.4 Stabilitet

Det er viktig med stabilitetsstudier ved validering av en ny metode, da disse skal kartlegge analyttens stabilitet ved prøvetaking, håndtering og lagring. Det er også viktig at stabilitetstesting reflekterer bruken av metoden. Derfor er det vanlig å teste stabiliteten ved lagring av prøvene (frysing), før og etter evt. prøveopparbeidelse (benkstabilitet og eluatstabilitet) og stabiliteten av prøvene i autosamplers. Disse trinnene er trinn hvor prøvene kan bli stående på vent, og man bør være klar over eventuelle effekter tid og temperatur kan ha på prøvene.

Stabiliteten til peptider i matriks kan variere mye, da blod, plasma og serum kan inneholde enzymer som modifiserer peptidene. Andre reaksjoner som kan skje er kjemisk degradering som oksidering og hydrolyse av peptidet [36]. Derfor er det viktig med stabilitetstester, samt velfungerende prøveopparbeidelser.

2.4.5 Utbytte

Utbytte er et mål på hvor mye analytt det er til stede i prøven etter at prøveopparbeidelsen er ferdig i forhold til utgangsmengden. Et høyt utbytte indikerer effektive ekstraksjonsprosedyrer, og gir høyere sensitivitet og nøyaktighet ved biologiske metoder. Det er i midlertidig ikke nødvendig med et høyt utbytte, det viktigste er at utbytte er konstant, presist og reproducerbart.

2.4.6 Matrikseffekter

Matrikseffekter er interferens (forstyrrelser) i ioniseringseffektiviteten ved tilstedeværelse av koeluerende komponenter fra prøvematriksen [37]. Slike komponenter kan være salter, vann og makromolekyler fra prøvematriksen, og de vil ikke synes i kromatogrammet ved vanlige analyser. Matrikseffekter har stor påvirkning på nøyaktigheten og sensitiviteten til metoden, og det er derfor viktig å undersøke om det er matrikseffekter til stede ved analyse av biologisk materiale.

3. Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 3.1-3.3 Kjemikalier, analytter og utstyr brukt i laboratoriearbeidet til denne oppgaven.

Tabell 3-1. Kjemikalier.

Navn	Kvalitet	Leverandør
Maursyre	> 98 % analysekvalitet	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Etanol	> 96 %	Acrus, Oslo, Norge
Acetonitril	Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA, Damstadt, Tyskland
Dextranulphate (natriumsalt)	Ikke oppgitt.	Merck eurolab, Briare le Canal, Frankrike
Vann	Ionebyttet	Millique

Tabell 3-2. Peptider.

Navn	Leverandør
BK 1-5	Bachem AG, Bubendorf, Sveits
BK 1-5 Heavy labelled (IS), (¹³ C ⁹ ¹⁵ N1)	Innovagen AB, Lund, Sverige
BK 1-6	Bachem AG, Bubendorf, Sveits
BK	Bachem AG, Bubendorf, Sveits

Tabell 3-3. Annet utstyr.

Navn	Type	Leverandør
Inndampingsenhet	Dri-block DB-3D	Fischer Scientific, Rockford, IL, USA
Vakuumanifold	N/A	Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA
Vakuumpumpe	N/A	Nerliens Kemisk-Tekniske aktieselskap, Oslo, Norge
Automatpipetter	BioHIT	Oyj, Helsinki, Finland
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR international, Leuven, Belgia
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Sentrifuge, kjøøl	Heraeus Multifuge 4 KR	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Tyskland
Vortex-mixer	IKA® MS3digital	IKA Works inc., Wilmington, NC, USA
Vannrenseanlegg	Milli-Q® Intergral 3	Millipore A/S, Norge
<i>Forbruksvarer</i>		
Pipettespisser	Finntip®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Eppendorfrør, LoBind (spesiallagd for proteiner)	Protein LoBind tube 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Vialer	N/A	Holger Teknologi, Oslo, Norge
Micro- inserts	0,1 mL clear glass	VWR international, Leuven, Belgia
Blodprøverør	Vacurette® 9 mL	Greiner labortechnik GMBH, Kremsmuenster, Østerrike
Corningrør	Corning Centrifuge Tube, 15 mL eller 50 mL	Corning Incorporated, NY, USA
SPE- kolonner	Resprep C18, 100 mg, 1 mL	Restek, Bellefonte, PA, USA
<i>LC-MS</i>		
Pumpe	2x LC-10AD vp	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU- 14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autorsampler	SIL-10AD vp	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor	LC-MS 2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Software	LCMS solution v. 2.04	Shimadzu, Kyoto, Japan

Kolonne	Biobasic C8 50x1mm, 5µm i.d.	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Systemkontrollenhet	SCL-10AVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
LC-MS/MS		
Pumpe	Dionex P680	Dionex corp., Sunnyvale, CA, USA
Degasser	SOR-100	Dionex corp., Sunnyvale, CA, USA
Autosampler	WPS- 3000TSL	Dionex corp., Sunnyvale, CA, USA
Detektor	LTQ XL	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Software	Chromeleon 6.8	Dionex corp., Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur 2.1	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Kolonne	Biobasic C8 50 x 1mm, 5µm i.d.	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Forkolonne	Biobasic C8 guard cartridge 10 x 1 mm, 5 µm i.d.	Thermo scientific, Rockford, IL, USA

3.1.1 Pasienter og prøvemateriale

De biologiske prøvene ble samlet inn på Rikshospitalet i samarbeid med Hudavdelingen, fra frivillige HAE-pasienter under og utenfor anfall.

3.2 Tillaging av løsninger

3.2.1 Peptidløsninger

I den første delen av oppgaven ble BK 1-6 brukt som intern standard (fram til validering punkt 4.3). I den andre delen (validering og analyse av pasientprøver- fra og med punkt 4.3 i oppgaven) ble BK 1-5 H brukt som intern standard. Stamlløsninger til BK, BK1-5, BK 1-6 og BK 1-5 H ble laget som beskrevet i tabell 3-4.

Tabell 3-4. Tillaging av peptidløsninger.

Navn	Innhold	Lages som følgende:
BK stamløsning 1 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • BK • Ionebyttet vann 	1,0 mg BK løses i 1,0 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør
BK 1-5 stamløsning 1 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • BK1-5 • Ionebyttet vann 	1,0 mg BK 1-5 løses i 1,0 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør
BK 1-6 stamløsning 1 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • BK 1-6 • Ionebyttet vann 	0,25 mg BK 1-6 løses i 0,25 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør
BK 1-5 Heavy labelled stamløsning 2,5 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • BK 1-5 H • Ionebyttet vann 	5,0 mg BK 1-5 H løses i 2,0 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør

Ønskede konsentrasjoner av peptidene ble laget ved å videre fortynne stamløsningene i ionebyttet vann til nye konsentrasjoner. Løsninger med peptidene sammen ble laget ved å fortynne stamløsningene i ionebyttet vann til nye konsentrasjoner og blande ulike fortynninger med hverandre til riktig blandingsforhold.

Løsningene ble oppbevart i fryser ved -32 °C og ble kun tatt frem ved behov. Løsningene ble plassert i fryser straks de var ferdig benyttet.

3.2.2 Løsninger til bruk ved laboratoriearbeid

Tabell 3-5. Tillagning av løsninger brukt ved laboratoriearbeid.

Navn	Innhold	Lages som følgende:
<i>Fast-fase ekstraksjon</i>		
Vaskeløsning	20 mM HCOOH	380 µL 100 % HCOOH / 500 mL ionebyttet vann
Elueringsmiddel	50:50 MeOH:20mM HCOOH	- 380 µL 100 % HCOOH /500 mL ionebyttet vann - 125 mL av denne løsningen blandes med 125 mL 100 % MeOH til totalt volum på 250 mL
<i>Kromatografi</i>		
Mobilfase A	5 % MeOH i 20 mM HCOOH	- 380 µL 100 % HCOOH / 500 mL ionebyttet vann - 475 mL av denne løsningen blandes med 25 mL 100 % MeOH - Settes på ultralydbad for å fjerne eventuelle luftbobler
Mobilfase B	5 % 20 mM HCOOH i MeOH	25 mL av 20 mM HCOOH blandes med 475 mL 100 % MeOH - Settes på ultralydbad for å fjerne eventuelle luftbobler
Mobilfase C	5 % MeOH i ACN	- 380 µL 100 % HCOOH / 500 mL ionebyttet vann - 475 mL av denne løsningen blandes med 25 mL 100 % ACN - Settes på ultralydbad for å fjerne eventuelle luftbobler
Mobilfase D	5 % 20 mM HCOOH i ACN	- 25 mL av 20 mM HCOOH blandes med 475 mL 100 % ACN - Settes på ultralydbad for å fjerne eventuelle luftbobler
<i>Løsning brukt under in vitro forsøk av bradykinindannelse</i>		
Dekstransulfat 5 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> Dekstransulfat Destillert vann 	5,0 mg dekstransulfat løses i 1,0 mL destillert vann

3.3 Prosedyrer

3.3.1 Prøvetaking

Pasientprøver ble tatt under og utenom anfall, i samarbeid med Rikshospitalet. Prøver til videreutvikling og optimalisering av metoden ble tatt på Farmasøytisk Institutt. Følgende protokoll ble brukt (se figur 3-1):

Forberedelser:

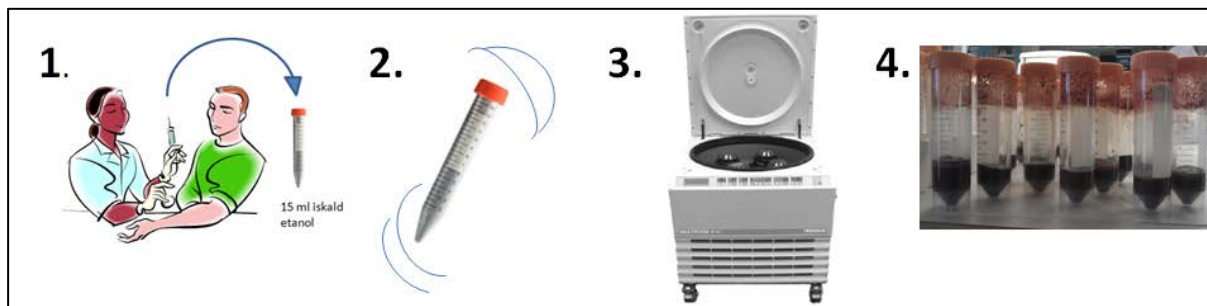
50 mL sentrifugerør i plast (Corning-rør) fylles med 15 mL 96 % etanol. Rørene plasseres i -20 °C frys.

Prøvetaking:

1. Rett før prøvetaking settes rørene med kald etanol på is.
2. 6 mL blod tappes i silikonert Vacutainer-rør med EDTA. 5 mL blod trekkes ut m/5 mL pipette og overføres umiddelbart over i den kalde etanolen.
3. Røret ristes kraftig/blandes umiddelbart, og blir stående på is i 1 time.
4. Røret sentrifugeres ved 2000 g i 25 min. Kjølesentrifuge og 4 °C.
5. Etter sentrifugering oppbevares rørene på is. Supernatanten avpippeteres og 5,5 mL overføres til 3 nye corningrør. Bunnfall etter sentrifugering kastes.

Oppbevaringen:

Prøvene plasseres i -70 °C (-80 °C) frys i påvente av analyse.



Figur 3-1. Prøvetaking. 1. 5 mL blod overføres direkte til 15 mL iskald etanol. 2. Røret ristes kraftig og blir stående på is i 1 time. 3. Røret kjølesentrifugeres i 25 min. på 2000 g og 4 °C. 4. Supernatanten overføres til nye rør og fryses i påvente av analyse.

3.3.2 Prøveopparbeidelse

Det ble utført SPE på de biologiske prøvene for å fjerne forurensinger og oppkonsentrere prøvene. Følgende metode ble brukt for fast- fase ekstraksjonen:

1. 20 μ L 0,5 μ g/mL BK 1-5 H tilsettes 4 mL av den etanoliske supernatanten.
2. Ved bunnfall sentrifugeres prøvene i 4 min. på 3000 g.
3. 4 mL etanolisk supernatant med intern standard dampes inn til tørrhet under nitrogen ved 60 °C.
4. Prøvene reløses i 3 mL 20 mM HCOOH.
5. Hele prøveløsningen påsettes en Resprep[®] C 18 SPE-kolonne med 100 mg pakkemateriale og volum på 1 mL, kondisjonert med først 1 mL MeOH og deretter 1 mL 20 mM HCOOH.
6. Kolonnen vaskes med 3 mL 20 mM HCOOH.
7. Analytten elueres ut med 1 mL 50:50 % MeOH: 20 mM HCOOH.
8. Eluatet dampes inn til tørrhet under nitrogen ved 60 °C.
9. Prøvene reløses i 50 μ L mobilfase A.
10. Ved bunnfall sentrifugeres prøvene i 4 min. på 3000 g.
11. Prøvene analyseres med LC-MS.

3.4 Analyse

3.4.1 LC-MS oppsett og metode

Følgende LC-MS parametere ble brukt i oppgaven (tabell 3-6 til 3-8).

Tabell 3-6. Kromatografiske parametere.

Kromatografiske parametere	
Mobilfase A-D	Som beskrevet i tabell 3-5
Kolonne	BioBasic C8 50 x 1 mm 5 µm
Injeksjonsvolum	20 µL
Flow	50 µL/min

Tabell 3-7. MS-parametere.

MS- parametere (SQ)	
Ionisering	ESI positive mode
Forstøvergass	N ₂
Hastighet på forstøvergass	1,5 mL/min
Tørkegass	N ₂
Hastighet på tørkegass	10-20 L/min
Blokktemperatur	200 °C
Kapillærtemperatur	225 °C
Kildespenning	4,5 kV
Kapillærspenning	15 V
Kollisjonsenergi	20
Scanintervall	1,0 sek
<i>m/z</i> i SIM-mode	BK: 354 <i>m/z</i> BK 1-5: 287 <i>m/z</i> BK1-6: 331 <i>m/z</i>
<i>m/z</i> i fullscan	300 <i>m/z</i> - 1100 <i>m/z</i>

Tabell 3-8. Gradient brukt med mobilfase A og B.

Gradient (tid)	Andel mobilfase B
0 min	0 % mobilfase B
10 min	55 % mobilfase B
12 min	55 % mobilfase B
13 min	0 % mobilfase B
20 min	0 % mobilfase B (rekondisjonering)

Det ble forsøkt ulike gradienter med mobilfase C og D, men ingen av disse gav tilfredsstillende resultater i forhold til mobilfase A og B.

3.4.2 LC-MS/MS oppsett og metode

Metoden ble implementert på ionefellen ved overføring fra SQ. Følgende LC-MS/MS parametere ble brukt (tabell 3-9 til 3-12). Det ble brukt flere måter å detektere peptidene på, se tabell 3-13.

Tabell 3-9. Kromatografiske parametere.

Kromatografiske parametere	
Mobilfase A og B	Som beskrevet i tabell 3-5.
Kolonne	Biobasic C8 50 x 1 mm 5 µm
Forkolonne	Biobasic C8 guard cartridge 10 x 1 mm 5 µm
Injeksjonsvolum	20 µL
Flow	50 µL/min

Tabell 3-10. Ionefellens detektor-settinger.

Detektor-settinger	
Mass range	Normal
Scan rate	Normal
Polaritet	Positiv
Data type	Centroid
Kollisjonsenergi	20
Wideband Activation	Ja

Tabell 3-11. MS/MS- parametere for ionefellen.

MS/MS- parametere	
Ionisering	ESI positive mode
Forstøvergass	N ₂
Hastighet på forstøvergass	25,00 units
Kapillærspenning	10,00 V
Kapillærtemperatur	275 °C
Kildespenning	4,0 kV
Maks. Injeksjons tid (ms)	Full scan: 10.000 (1 microscan) SIM: 50.000 (1 microscan)
Kollisjonsenergi	20
Kollisjonsgass	He
Auxiliary gas	N ₂
Tube lens (V)	45,00 V
Scanintervall	30,00 ms

Tabell 3-12. Gradient brukt i metoden ved ionefellen.

Gradient (tid)	Andel mobilfase B
0 min	0 % mobilfase B
10 min	55 % mobilfase B
12 min	55 % mobilfase B
12,1 min	100 % mobilfase B
14 min	100 % mobilfase B
14,1 min	0 % mobilfase B
27 min	0 % mobilfase B (rekondisjonering)

Tabell 3-13. Fullscan og SRM-betingelser.

Scan type	Peptid	<i>m/z</i> verdier
Fullscan	BK, BK1-5 og BK 1-6	300 -1100
SRM	BK	354, 30 → 321,82 354, 30 → 348,78
	BK 1-5	287, 25 → 320,16 287, 25 → 408,29
	BK 1-6	330,80 → 321,76 330,80 → 555,52
Daughter ion scan	BK (354,30 <i>m/z</i>)	Lavest mulig masse – 1200
	BK 1-5 (287,25 <i>m/z</i>)	Lavest mulig masse- 600
	BK 1-5 H (292,17 <i>m/z</i>)	Lavest mulig masse - 700
Daughter ion scan med EIC	BK	-
	BK 1-5	287,25 → 319,70-320,70 287,25 → 407,70 -408,70
	BK 1-5 H	292,17 → 329,70- 330,70 292,17 → 407,70.408,70

3.5 *In vitro* forsøk av bradykinindannelse

I forbindelse med valideringen ble det undersøkt om det var mulig å anskaffe fullblod fritt for BK 1-5. Fullblod ble tappet fra frivillige, og 5 ulike forsøk ble gjennomført for å finne ut hvilke betingelser som var nødvendig for å få fullblod fritt for BK 1-5.

Blodforsøk 1- tidskurve av BK 1-5

Vi ønsket å undersøke hvor lang tid det tok for å få BK 1-5-fritt blod. Forsøket ble gjennomført ved å tappe 6 mL blod i silikonert Vacutainer-rør med EDTA. 1 mL blod trekkes ut med pipette og overføres umiddelbart over i 3 mL iskald etanol, deretter følges vanlig prosedyre av prøvetaking. Vacutainer-røret med blod blir stående på benken, og ny 1 mL blod trekkes ut med pipette og overføres til 3 mL iskald etanol etter 3 timer, 6 timer, 24 timer og 48 timer. Det ble laget 2 paralleller ved hvert uttak.

Blodforsøk 2: DXS – aktivering av hele BK- potensialet – korttidsmonitorering

Eksperimentet ble gjennomført ved å tappe 6 mL blod i silikonert Vacutainer-rør med EDTA og tilsatt 60 µL 5 mg/mL dekstransulfat. Røret blandes kraftig og blir stående i 10 minutter på is. 1 mL blod trekkes ut med pipette og overføres umiddelbart over i 3 mL iskald etanol, deretter følges vanlig prosedyre av prøvetaking. Vacutainer-røret med blod og dekstransulfat blir stående på benken, og ny 1 mL blod trekkes ut med pipette og overføres til 3 mL iskald etanol etter 3, 6, 24 og 48 timer. Det ble laget 2 paralleller ved hvert uttak.

Blodforsøk 3: DXS – aktivering av hele BK- potensialet - langtidsmonitorering

Eksperimentet ble gjennomført ved å tappe 6 mL blod i silikonert Vacutainer-rør med EDTA og tilsatt 60 µL 5 mg/mL dekstransulfat. Røret blandes kraftig og blir stående i 10 minutter på is. 1 mL blod trekkes ut med pipette og overføres umiddelbart til 3 mL iskald etanol, deretter følges vanlig prøvetakingsprosedyre. Dette gjentas ved 24, 48, 120 og 216 timer. Det ble laget 2 paralleller ved hvert uttak.

Blodforsøk 4: Blodpose

Vi ønsket å undersøke BK 1-5 potensialet i en blodpose tappet fra Blodbanken.

1 mL fullblod fra en blodpose, tappet 3 timer i forveien, ble overført med pipette til 3 mL iskald etanol. Det lages 2 paralleller. Deretter følges vanlig prøvetakingsprosedyre. Forsøket ble gjentatt ved dag 3 ($n=5$) og dag 20 ($n=4$). Blodposen ble oppbevart i kjøleskap (4 °C).

3.6 Validering

Fullvalideringen av metoden som er utviklet her er basert på FDAs *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* [35] og EMEAs *Guideline on validation of bioanalytical methods* [34]. Da analytten er et endogent peptid har disse valideringskravene blitt brukt *veiledende*.

Prøvematerialet brukt under valideringen er tappet fra én frivillig blodgiver, etter prosedyre av prøvetaking (se punkt 3.3.1). Før prøvematerialet ble fordelt i 15 mL corningrør, ble prøvene samlet i en felles beholder. Dette var for å kartlegge og minimere variasjon mellom prøvene,

slik at man får et felles utgangspunkt for valideringen. Denne "poolingen" ble gjort både før og etter prøvene ble fryst i påvente av analyse.

Ved analyse av prøvene ble det brukt blankprøver inneholdende mobilfase A mellom hver prøve, dette for å minimalisere carryover-effekten. For å være sikker på at analysesystemet fungerte normalt ble det kjørt quality control (QC) prøver fordelt jevnt mellom analyseprøvene. QC- prøven inneholdt BK 1-5 1 ng/mL og BK 1-5 Heavy labelled (IS) 10 ng/mL.

Analysene ble foretatt ved å kjøre daughter ion scan vha. mass list og EIC (se tabell 3-13). Nedenfor beskrives valideringsparameterne mer i detalj.

3.6.1 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon ble undersøkt på to nivåer, intradag og interdag. Intradag presisjonen ble undersøkt ved å analysere 3 konsentrasjonsområder (0,15 ng/mL, 0,75 ng/mL og 10 ng/mL) med 5 paralleller på hvert konsentrasjonsområde. Interdagpresisjonen ble undersøkt ved å analysere 3 konsentrasjonsområder (0,15 ng/mL, 0,75 ng/mL og 10 ng/mL) med 5 paralleller på hvert konsentrasjonsområde på 5 ulike dager. Gjennomsnittet av disse dagene representerer interdagpresisjonen.

Nøyaktigheten ble bestemt ved 5 enkeltanalyser for 3 konsentrasjonsområder (0,15 ng/mL, 0,75 ng/mL og 10 ng/mL). Gjennomsnittsverdien for hvert konsentrasjonsområde ble beregnet, og den skal være innenfor 15 % av sann verdi. Ved deteksjonsgrensen kan nøyaktigheten være innenfor 20 % av sann verdi. Sann verdi ble estimert ut i fra kalibreringskurven (se punkt 3.6.2).

3.6.2 Linearitet

Kalibreringskurven beskriver lineariteten, og består av 2 blankprøver (ikke tilsatt noe), 2 nullprøver (kun tilsatt intern standard), og minimum 2 paralleller fra 6 ulike konsentrasjoner som dekker hele konsentrasjonsområdet. Konsentrasjonsnivåene som ble brukt i kalibreringskurven var 0,05ng/mL, 0,15 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,75 ng/mL, 1 ng/mL og 10 ng/mL.

3.6.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

For å estimere deteksjonsgrensen beregnes intensitetsforholdet mellom topphøyden til analytten og høyden til støyen (S/N). Toppintensiteten av analytt og av støyen beregnes ut i fra kromatogrammene i kalibreringskurven. Kravet er satt til 3, og beregnes ved følgende formel:

$$\text{Signalintensiteten BK 1-5} / 3 \times \text{Støyintensiteten} = \text{faktor} \rightarrow$$

$$\text{Konsentrasjonsnivået/faktor} = \text{LOD}$$

LOD ble estimert ved 4 paralleller og presentert som gjennomsnittet av disse.

Kvantifiseringsgrensens krav er satt til 10, og toppintensiteten av analytt og av støyen beregnes ut i fra kromatogrammene i kalibreringskurven. LLOQ estimeres ut i fra følgende formel:

$$\text{Signalintensiteten BK 1-5} / 10 \times \text{Støyintensiteten} = \text{faktor} \rightarrow$$

$$\text{Konsentrasjonsnivået/faktor} = \text{LLOQ}$$

LLOQ ble estimert ved 4 paralleller og presentert som gjennomsnittet av disse.

3.6.4 Stabilitet

For å undersøke stabiliteten til analytten gjennom hele metodeforløpet, ble stabiliteten sjekket før og etter prøveopparbeidelse (benk- og eluatstabilitet), ved «lagring» i autosampler og ved lagring (frys og tin).

På benk (EtOH + blod)

2 paralleller av etanolisk supernatant ved to konsentrasjonsnivåer (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble tint på benken, og ble stående i 24 timer ved romtemperatur før prøveopparbeidelse og analyse. Totalt 4 prøver.

2 paralleller av etanolisk supernatant ved to konsentrasjonsnivåer (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble tint på benken 4 timer før 24-timersprøvene var ferdig, og ble stående i 4 timer ved romtemperatur før prøveopparbeidelse og analyse. Totalt 4 prøver.

2 paralleller av etanolisk supernatant ved to konsentrasjonsnivåer (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble tint ved romtemperatur rett før analyse og fungerte som nullprøver. Totalt 4 prøver.

Til sammen ble det laget 12 prøver. Etter analyse ble nullprøvene sammenlignet med 4- og 24- timersprøvene, og de bør ikke ha mer enn 15 % avvik fra nullprøvene.

Frys-tine

3 paralleller av etanolisk supernatant fra lav og høy konsentrasjon (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble tint manuelt og stående på benken i 30 min, før de ble fryst i 24 timer. Deretter ble dette gjentatt to ganger til, men da med frysing av prøvene i 12 timer av gangen. Etter tredje syklus ble prøvene analysert. Det ble laget nullprøver ved to ulike konsentrasjonsnivåer (hhv. 0,15 ng/mL (n=3) og 10 ng/mL (n=3)). Nedenfor er oppsettet for forsøket (tabell 3-14). Prøvene hadde alle vært fryst før forsøket startet.

Tabell 3-14. Oversikt over frys- og tin forsøket.

	Ant.prøver	Nivå	Dag 1	Dag 2	Dag 2	Dag 3
Linje 1	3 paralleller	Lav kons. 0,15 ng/mL	Tines ut, så fryses de til dag 4			Prøvene tines, så opparbeides/ analyseres
	3 paralleller	Høy kons. 10 ng/mL	Tines ut, så fryses de til dag 4			
Linje 2	3 paralleller	Lav kons. 0,15 ng/mL	Tines ut, så fryses i 24 timer	Tines så fryses de i 12 timer		
	3 paralleller	Høy kons. 10 ng/mL	Tines ut, så fryses i 24 timer	Tines så fryses de i 12 timer		
Linje 3	3 paralleller	Lav kons. 0,15 ng/mL	Tines ut, så fryses i 24 timer	Tines så fryses de i 12 timer	Tines så fryses de i 12 timer	
	3 paralleller	Høy kons. 10 ng/mL	Tines ut, så fryses i 24 timer	Tines så fryses de i 12 timer	Tines så fryses de i 12 timer	

Eluat

3 paralleller av vandig standard (som beskrevet under punkt 3.2.1) fra lav og høy konsentrasjon (hh.v. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble tilsatt 50:50 20 mM HCOOH: MeOH, og ble stående på benken i 4 og 24 timer, før de ble inndampet, reløst og analysert. Det ble laget nullprøver; 3 paralleller av peptidløsning i vann fra lav og høy konsentrasjon (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL). 4- og 24- timersprøvene ble sammenlignet med nullprøvene etter analyse, og prosentvis avvik fra nullprøvene ble beregnet. Det er ønskelig med et avvik på < 15 % fra nullprøvene.

I autosampler

2 paralleller av vandig standard fra lav og høy konsentrasjon (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) tilsettes 20 mM HCOOH til totalt volum 50 µL, og ble stående i autosampler i 4 og 24 timer, før de analyseres. Nullprøver fra lav og høy konsentrasjon (hhv. 0,15 ng/mL og 10 ng/mL) ble laget rett før analysen. Til sammen ble det laget 12 prøver. 4- og 24-timersprøvene ble etter analyse sammenlignet med nullprøvene, og det var ønskelig med et avvik på < 15 % fra nullprøvene.

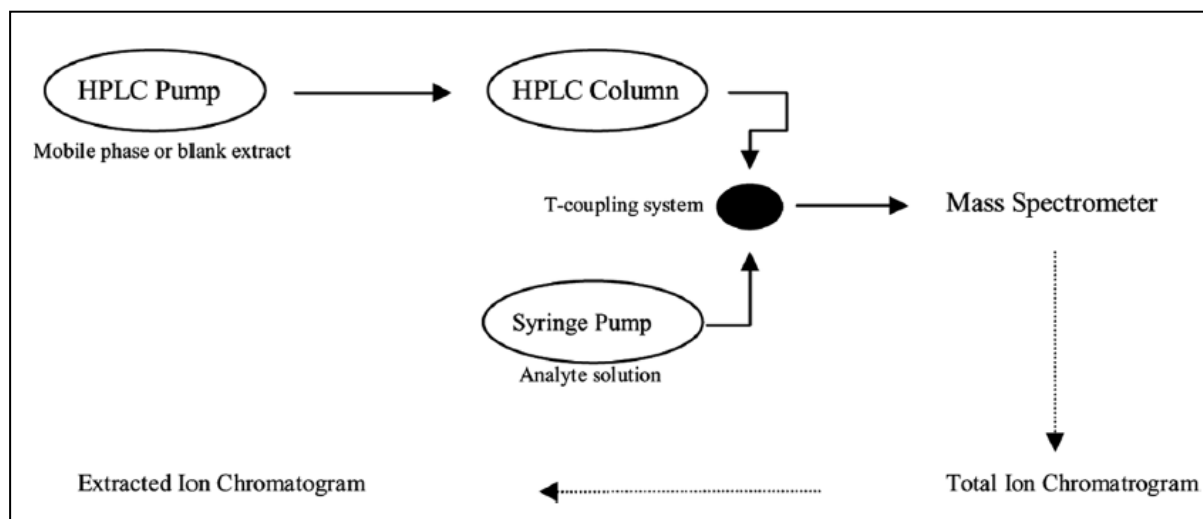
3.6.5 Utbytte

Utbyttet ble bestemt ved 3 konsentrasjonsnivåer (0,15 ng/mL, 0,75 ng/mL og 10 ng/mL), i biologisk materiale og i referanseløsninger som representerer 100 % utbytte. Følgende prosedyre ble utført: 2 paralleller fra hvert konsentrasjonsnivå gjennomfører normal prøveopparbeidelse. Deretter lages referanseløsningene, som består av 30 µL mobilfase A + 10 µL BK 1-5 + 10 µL BK 1-5 H (IS). Referanseløsningene er tilsatt den mengden BK 1-5 som tilsvarer 0,15 ng/mL, 0,75 ng/mL og 10 ng/mL, medberegnet en oppkonsentreringsfaktor på 20. Tilslutt ble utbytte beregnet ved å sammenligne de biologiske prøvene med referanseløsningene (100 %).

3.6.6 Matrikseffekter

Matrikseffektene i denne oppgaven ble undersøkt ved "postcolumn infusion"-fremgangsmåten. Dette innebærer å injisere en konstant konsentrasjon av analytt etter kolonnen, men før ioniseringskammeret (figur 3-2). En prøve uten tilsatt analytt blir analysert

under riktige kromatografiske betingelser og responsen til den injiserte analytten detekteres. Analyttresponsen vil detekteres gjennom hele analysen, og et plutselig fall eller økning av signalet gir uttrykk for matrikseffekter [38].



Figur 3-2. Skjematisk oversikt over "postcolumn infusion" [38].

På grunn av den naturlige variasjonen blant populasjonen, ble matrikseffekten undersøkt ved blodprøver fra friske frivillige. Blodprøver fra 6 friske frivillige personer ble tatt og opparbeidet som nevnt under 3.3.1. Siden blodprøvene kan inneholde BK 1-5 ble undertrykking undersøkt på BK 1-5 H. I sprøytepumpen ble det brukt en BK 1-5 H løsning med konsentrasjon 100 ng/mL. Prøvene ble injisert, og endring i BK 1-5 H signalet ble monitorert på t_R der BK 1-5 / BK 1-5 H kommer.

3.7 Studiedesign

Det vitenskapelige navnet på studien er " *Hereditary angioedema and other bradykinin-mediated angioedemas- mapping of mutational spectrum and phenotypes*", men betegnes under kortnavnet "Bradykinin-utløste angioødemer" [39]. Studien ledes av prosjektleder Linn Landrø (dr. med.) ved Hudavdelingen på Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus. Studien utføres ved Rikshospitalet, og den er godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk. Studien har flere målsetninger, blant annet å etablere en målemetode som kan måle bradykinin og metabolitten BK 1-5 i blod, slik at man kan se hvordan bradykinin omsettes hos personer som har HAE [39]. Dette er viktig for å kunne stille riktig diagnose og kunne velge rett behandling ved angioødem. Deltakerne vil

gjennomgå et strukturert intervju/spørreskjema for å kartlegge type, alvorlighetsgrad og hyppighet av anfallene. Spørreskjemaet er utenfor denne oppgaven, og vil ikke bli utdypet her. Forskningsgruppen ber om at det blir tatt blodprøve under anfall, samt en kontrollprøve tatt i etterkant av anfallet. Det har blitt opprettet en poliklinikk ved hudavdelingen på Rikshospitalet, hvor pasienter med diagnostisert HAE kan bli inkludert i studien. Deltagelse i studien er frivillig og det ble innhentet skriftlig informert samtykke fra alle deltagende pasienter [39, 40]. Studien fortsetter etter at denne oppgaven er ferdig.

Prosjektet har fått oppstartmidler fra legemiddelfirmaet Shire som lager medikamentet Firazyf (godkjent for behandling av HAE). Firmaet har ikke rett til innsyn i dataene som lagres, ei heller påvirker de hva som skal undersøkes eller hvordan data skal presenteres [40].

Studien mottok fire pasienter med anfall i løpet av denne oppgaven. 3 av 4 anfallsprøver ble tappet på Rikshospitalet, mens resten av prøvetakningen (sentrifugering, fordeling av supernatant og analyse av prøvene) ble gjennomført ved Farmasøytisk Institutt. 1 prøve ved begynnende HAE-anfall ble tappet ved Farmasøytisk institutt. Det ble tatt 2 kontrollprøver. Begge kontrollprøvene ble tappet på Rikshospitalet, med påfølgende prosedyre utført på Farmasøytisk institutt. Normalprøver fra 6 friske frivillige ble tatt ved Farmasøytisk Institutt.

4. Resultater og diskusjon

4.1 Metodeutviklingsdel

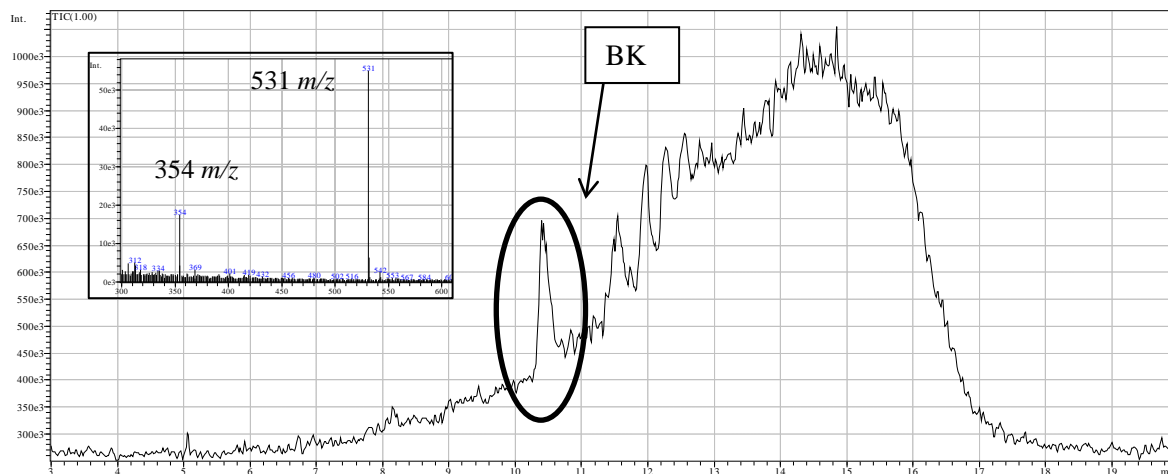
Metoden som er optimalisert og videreutviklet i denne oppgaven baserer seg på Murphy og Seips tidligere arbeid [1, 2].

4.1.1 Mulig inklusjon av BK i LC-MS metoden

Det var ønskelig å implementere BK i metoden, for å se om det var mulig å detektere BK-nivået ved prøvetaking. Det ble kjørt fullscan på singel kvadrupolen, og dette gav en topp med retensjonstid på 10,4 min. Følgende m/z verdier ble funnet (se innfeltet figur 4-1):

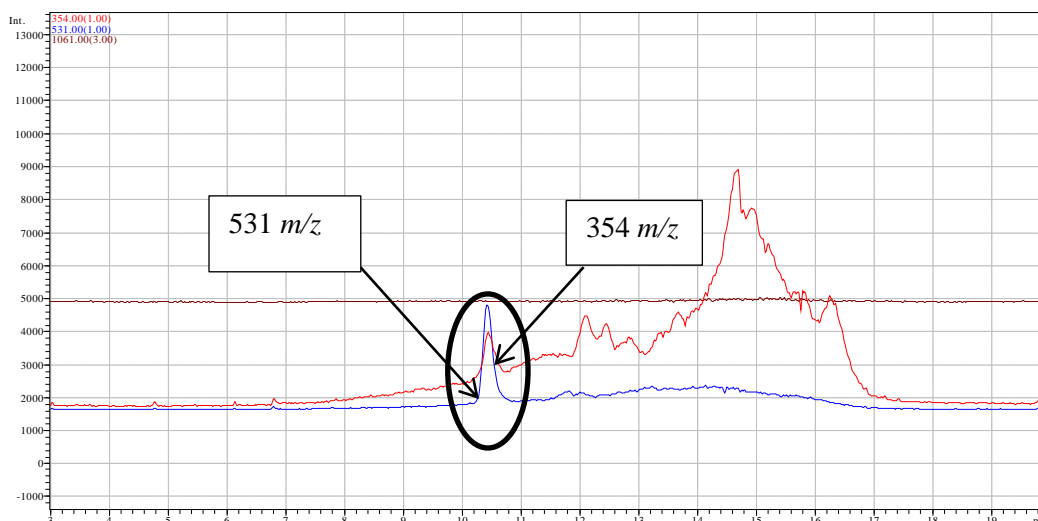
- 354 m/z ($M+3H$)³⁺
- 531 m/z ($M+2H$)²⁺

Massen til den enkeltladete BK ($[M+H]^+ = 1061$) ble ikke detektert.



Figur 4-1. Fullscan av BK 200 ng/mL, injisert 20 μ L. Innfeltet vises m/z -verdiene 354 og 531 m/z til BK.

Disse m/z verdiene stemmer overens med hva litteraturen oppgir [5]. m/z verdiene ble valgt videre for SIM. Både m/z verdi 354 og 531 ble detektert på samme retensjonstid (10,4 min.), se figur 4-2.



Figur 4-2. SIM BK 200 ng/mL, injisert 20 μ L. Rød linje= 354 m/z, blå linje= 531 m/z og svartlinje= 1061 m/z. BKs retensjonstid= 10,4 min. Den store toppen som kommer etter 12 minutter er forurensing fra mobilfasen.

Å kunne måle pålitelige BK nivåer ved HAE-anfall er svært vanskelig på grunn av den korte halveringstiden til BK. Selv om BK er implementert i metoden, ble det valgt å bruke den stabile metabolitten BK 1-5 som en indirekte markør på BK- genereringen, for å oppnå robuste og akseptable analyser.

4.1.2 Innledende forsøk

Opprinnelig ble det brukt acetonitril (ACN) som organisk modifikator i mobilfasen, men på grunn av leveringsvansker for ACN under utviklingen av metoden i oppgaven til Seip ble det brukt MeOH [2]. Det var nå lettere å få tak i ACN, og vi undersøkte om ACN ville være en bedre mobilfase. Følgende mobilfase ble brukt:

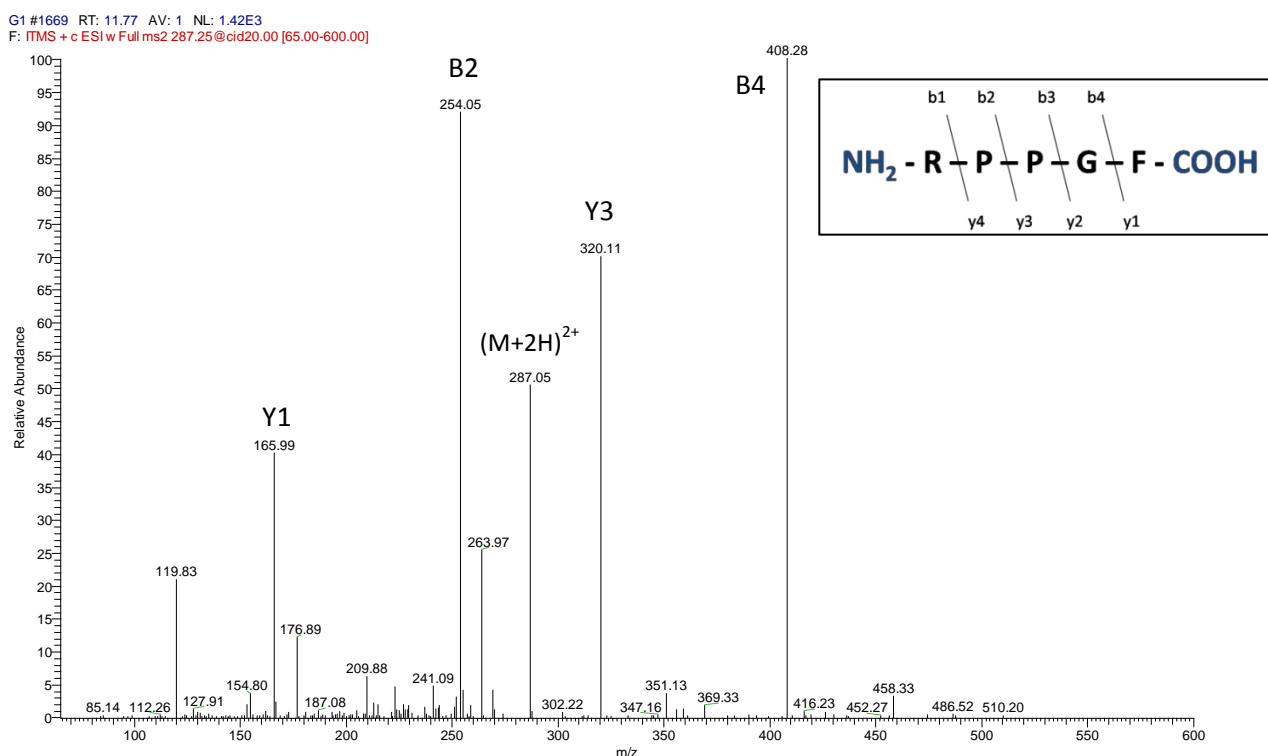
Mobilfase C	20 mM 95 % Maursyre + 5 % ACN
Mobilfase D	95 % ACN + 20 mM Maursyre

Det ble kjørt standarder av BK, BK 1-5 og BK 1-6 (intern standard) med hhv. følgende konsentrasjoner: 100 ng/mL, 10 ng/mL og 100 ng/mL, samt at flere ulike gradienter ble undersøkt (resultater ikke vist). Utfordringen med bruk av ACN i mobilfasen var haledannelse, lav intensitet til BK 1-6 (IS), samt at toppene ble "utydelige". Det ble konkludert med og bekreftet at metanol var en bedre mobilfase å bruke til denne metoden.

4.1.3 Implementering på lineær ionefelle

En lineær ionefelle vil gi en høy analytisk følsomhet i forhold til en SQ, og det er mulig å påvise svært lave konsentrasjoner i biologisk materiale. Dette er viktig i forbindelse med at rapporterte referansemengder av endogen BK og endogen BK 1-5 ligger på pikogram nivå, og slik sensitivitet oppnås ikke med SQ for denne analytten. HPLC metoden som ble brukt for SQ analysen ble tilpasset til ionefelle LC-MS/MS og en analyse av BK (200 ng/mL), BK 1-5 (100 ng/mL) og BK1-6 (200 ng/mL) ble utført. Deteksjonen var basert på SRM. For å kunne analysere peptidene i SRM på ionefellen ble det tatt MS/MS spektra av de aktuelle peptidene. Ut i fra disse ble det bestemt hvilke overganger som skulle velges til SRM og følgende masseoverganger for BK 1-5 ble valgt ut fra MS-spekteret (se figur 4-3):

- $287,25\text{ m/z} \rightarrow 320,16\text{ m/z}$ (y3)
- $287,25\text{ m/z} \rightarrow 408,29\text{ m/z}$ (b4)



Figur 4-3. MS/MS- spekteret av BK 1-5, hvor masseovergangene $287,25\text{ m/z} \rightarrow 408,29\text{ m/z}$ (b4) og $287,25\text{ m/z} \rightarrow 320,16\text{ m/z}$ (y3) ble valgt. Noen av b og y fragmentene er angitt. Innfeltet viser mulige fragmentioner til BK 1-5.

Valg av masseoverganger for BK og BK 1-6 ble gjort ved å optimalisere MS-parametre på 354,30 m/z (BK) og 330,80 m/z (BK 1-6), og fragmentene med høyest intensitet ble valgt ut (data ikke vist).

Følgende masseoverganger ble valgt for BK ut fra MS-spekteret ved tuning:

- 354,30 $m/z \rightarrow 348,34 m/z$
- 354,30 $m/z \rightarrow 321,83 m/z$

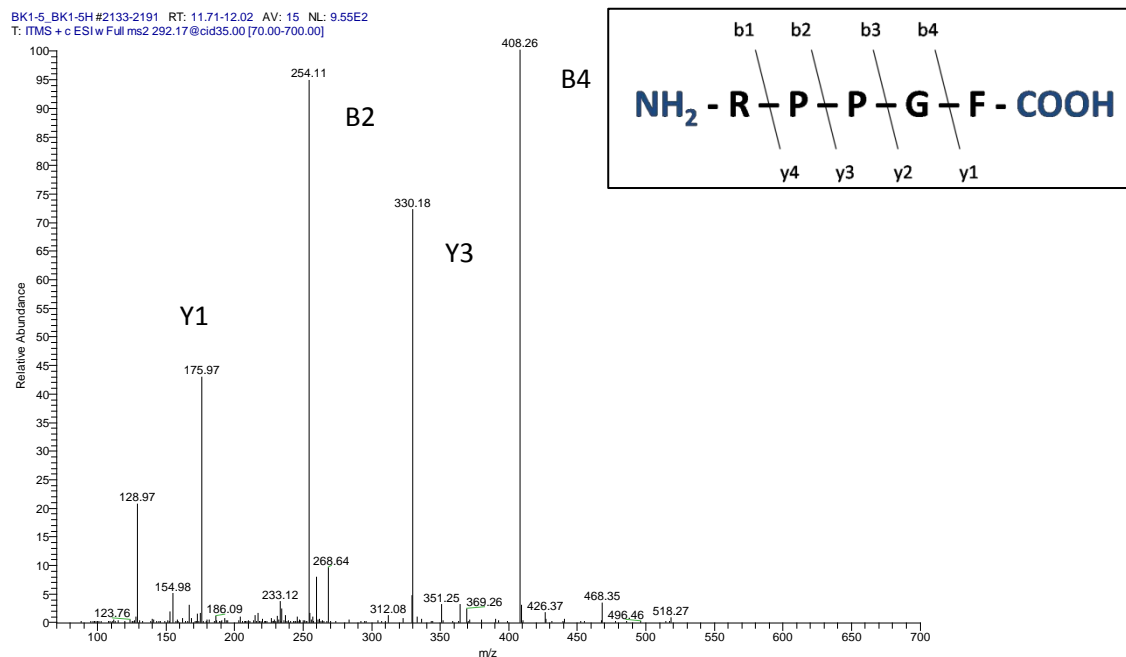
Følgende masseoverganger ble valgt for BK 1-6 ut fra MS-spekteret ved tuning:

- 330,80 $m/z \rightarrow 555,52 m/z$ (b5)
- 330,80 $m/z \rightarrow 321,76 m/z$ ($M+2H - H_2O$)²⁺

Ved implementering av den tunge internstandarden i metoden, BK 1-5 Heavy labelled, ble 100 ng/mL BK 1-5 H injisert ved hjelp av sprøyte inn i ionekilden. Fragmentet 292,17 ble valgt (data ikke vist). Følgende masseoverganger ble valgt for 292,17 m/z (se figur 4-4):

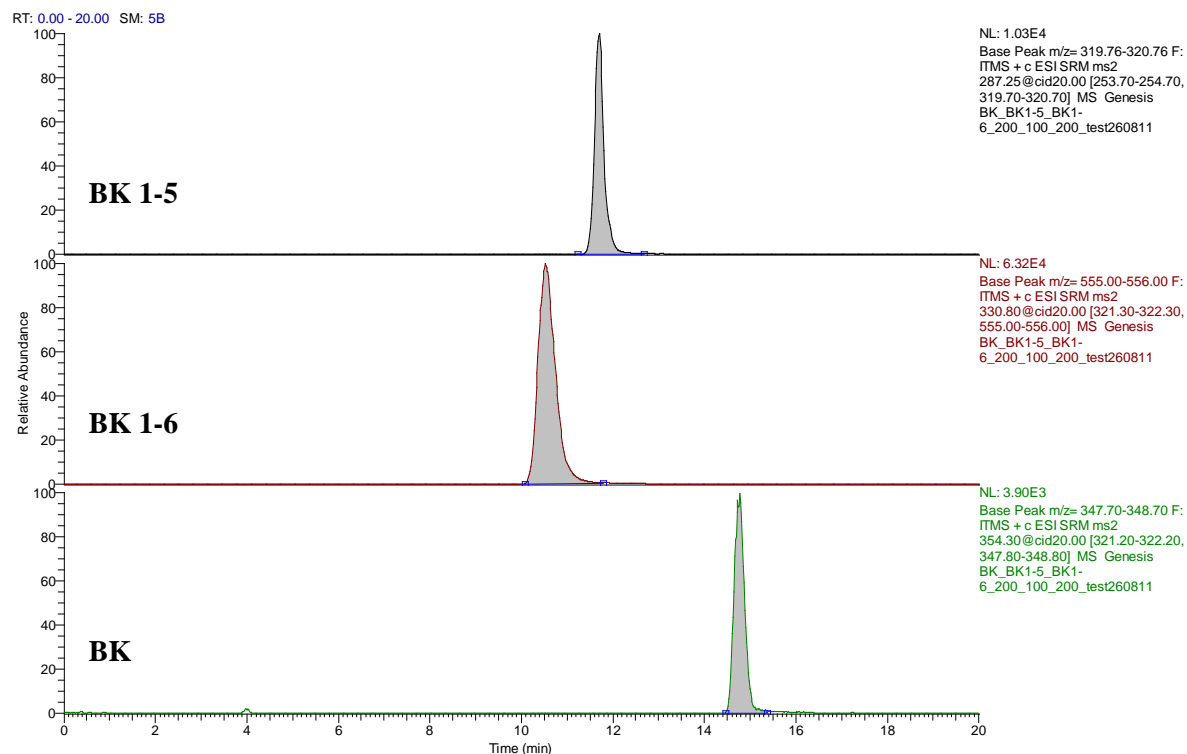
- 292,17 $m/z \rightarrow 330,18 m/z$ (y3)
- 292,17 $m/z \rightarrow 408,26 m/z$ (b4)

BK 1-5 H er en tung intern standard hvor aminosyren fenylalanin (Phe) har byttet ut 9 karbonatomer med ¹³C og ett nitrogenatom med ¹⁵N. Dette tilsvarer en økt masse med 10 daltons og ses ved et masseskift på 10. Fragmentet y3 får dermed en m/z verdi på 330,18 m/z (figur 4-4).



Figur 4-4. MS-spekteret til BK 1-5 H (292,17 m/z) hvor følgende masseoverganger ble valgt: 292,17 m/z \rightarrow 330,18 m/z og 292,17 m/z \rightarrow 408,26 m/z. Innfeltet viser mulige fragmentioner av BK 1-5 H.

For kromatografisk fremvisning av en LC-MS/MS analyse på ionefellen se figur 4-5.



Figur 4-5. Kromatogram ved implementering av metoden på ionefellen.

På grunn av utfelling av ukjent årsak ved siste trinn i prøveopparbeidelsen, var det nødvendig å bruke en forkolonne før den kromatografiske separasjonen ved analyse på LC-MS/MS systemet. Ved bruk av forkolonne forlenger man levetiden til separasjonsskolonnen, og hindrer at kolonnen tettes av partikler fra prøveløsningen. På grunn av økt tid før analytten ankommer separasjonsskolonnen med mobilfasen, var det nødvendig å endre gradienten noe. Det ble lagt til 5 ekstra minutter til rekondisjonering for å kompensere for bruk av forkolonne. Endelig gradient kan ses i tabell 3-12.

4.1.4 Bruk av intern standard

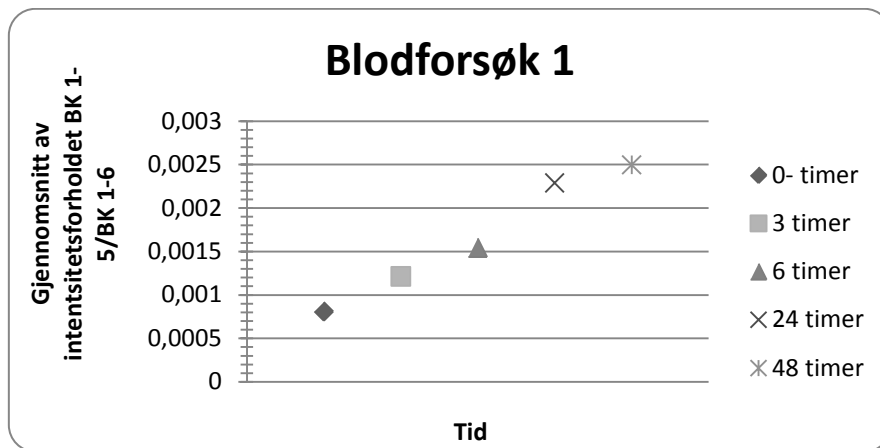
I tidligere arbeid [2] ble BK 1-6 brukt som intern standard. Dette ble videreført i denne oppgaven frem til validering. Fra og med seksjon 4.3 ble det brukt en isotop merket intern standard, BK 1-5 H.

4.2 *In vitro* forsøk av bradykinindannelse

I forbindelse med valideringen ble det undersøkt om det var mulig å anskaffe blod fritt for BK 1-5.

Blodforsøk 1: tidskurve av BK 1-5

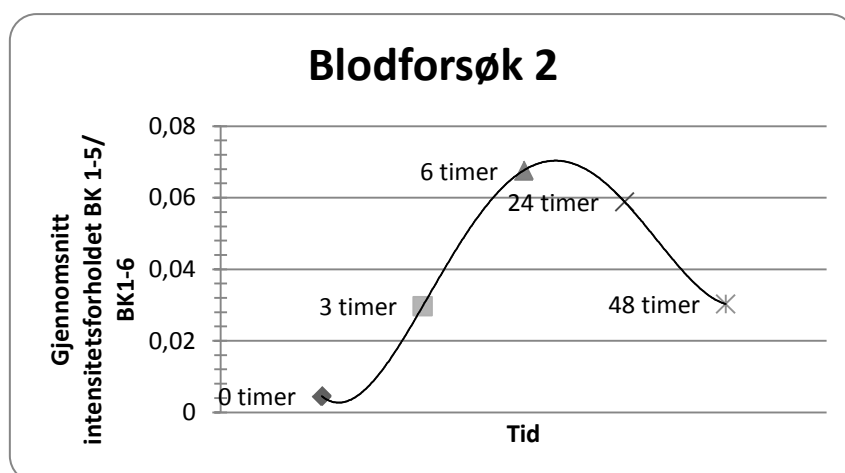
Teorien bak forsøket var at ulike enzymer i blodet ville bryte ned BK og BK 1-5, og at man til slutt ville få blod fritt for BK 1-5. Figur 4-6 viser nivåene av BK 1-5 i forhold til tid. Ved å la blodprøven bli oppbevart i vacutainer-røret i blodforsøk 1, så man en markant økning av BK 1-5 nivået i prøven over tid. Dette skyldes kontaktaktiveringsprosessen, som oppstår direkte ved prøvetakning, og ved kontakt med den negative ladde overflaten til glasset i vacutainer-røret. Det ble klart at enzymene i blodet som bryter ned og genererer BK, fremdeles er til stede og aktive etter prøvetakning, som beskrevet i litteraturen. Dessverre avtok ikke kontaktaktiveringsprosessen innen 48 timer, og det var ikke mulig å oppnå blod fritt for endogen BK 1-5 ved å vente.



Figur 4-6. Nivået av BK 1-5 over tid. MS-mode: SRM.

Blodforsøk 2 DXS: aktivering av hele BK- potensialet - korttidsmonitorering

Mengden med BK 1-5 i blodforsøk 1 økte over tid, istedenfor en forventet minskning. Dette kan bli forklart med at det var en kontinuerlig produksjon av BK som igjen ble nedbrutt til BK 1-5. Hypotesen med følgende forsøk var å tømme potensialet av BK (og dermed BK 1-5) ved å tilsette en kjent aktivator av kontaktaktiveringssystemet. Dekstransulfat (DXS), med sin negativ ladde overflate, er en svært potent aktivator av kontaktaktiveringssystemet [20]. Figur 4-7 viser en massiv generering av kontaktaktiveringsprosessen når DXS er tilsatt. BK 1-5 nivået ved 6 timer i figur 4-7 har en 40 ganger økning i forhold til BK 1-5 nivået ved 6 timer i figur 4-6 (blodforsøk 1), og tyder på en massiv generering av BK. Det oppstod en maksimum BK 1-5 konsentrasjon i prøven etter ca 6 timer, men selv etter 48 timer var nivåene av BK 1-5 for høye til å brukes som nullprøver ved validering. På bakgrunn av dette ønsket vi å utføre forsøket på nytt, men over lengre tid (se blodforsøk 3).

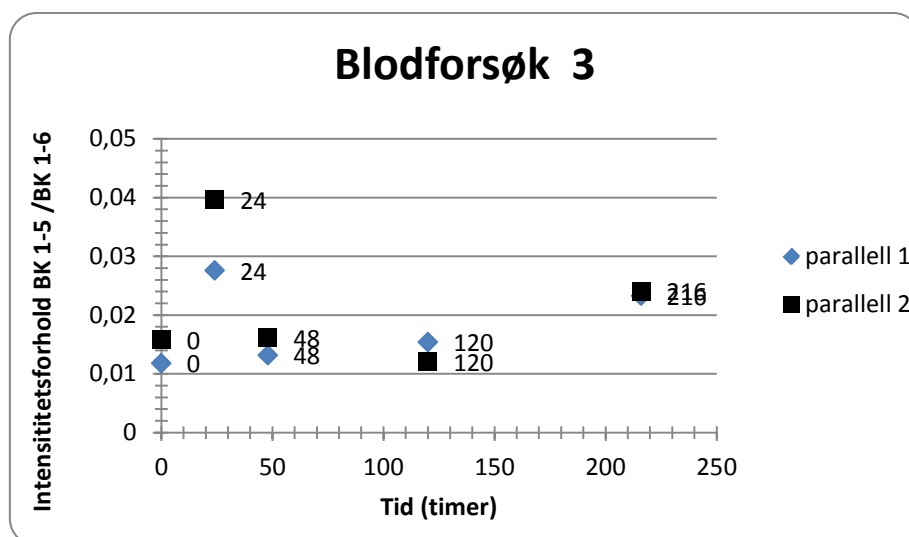


Figur 4-7. Nivået av BK 1-5 med tilsatt DXS, korttidsmonitorering. MS-mode: SRM.

Blodforsøk 3 DXS: aktivering av hele BK- potensialet - langtidsmonitorering

Vi ønsket å se hvor lang tid det tok før man fikk BK1-5 fritt blod ved hjelp av en aktivator av kontaktaktiveringssystemet, og gjennomførte et langtidsforsøk på bakgrunn av blodforsøk 2. Figur 4-8 viser at kontaktaktiveringsprosessen ble aktivert av DXS, og man oppnådde massiv generering av BK-potensialet i prøven, slik man så i blodforsøk 2. Etter 24 timer begynte BK 1-5 nivået raskt å avta, og det ble liggende på et betydelig lavere nivå i noen dager. På slutten av forsøket økte derimot konsentrasjonen av BK 1-5 i prøven. Dette skyldes trolig ny kontakt mellom dekstransulfat og blodet ved blanding før det tas ut 1 mL til prøveoppbevaring.

Ut i fra både blodforsøk 2 og 3 kan det derfor sies at selv om BK potensialet ble minsket betydelig, var det fremdeles betraktelige mengder BK 1-5 til stede, selv etter 216 timer. Dette gjør at det konkluderes at begge forsøkene ikke kan generere blod fritt for BK 1-5.

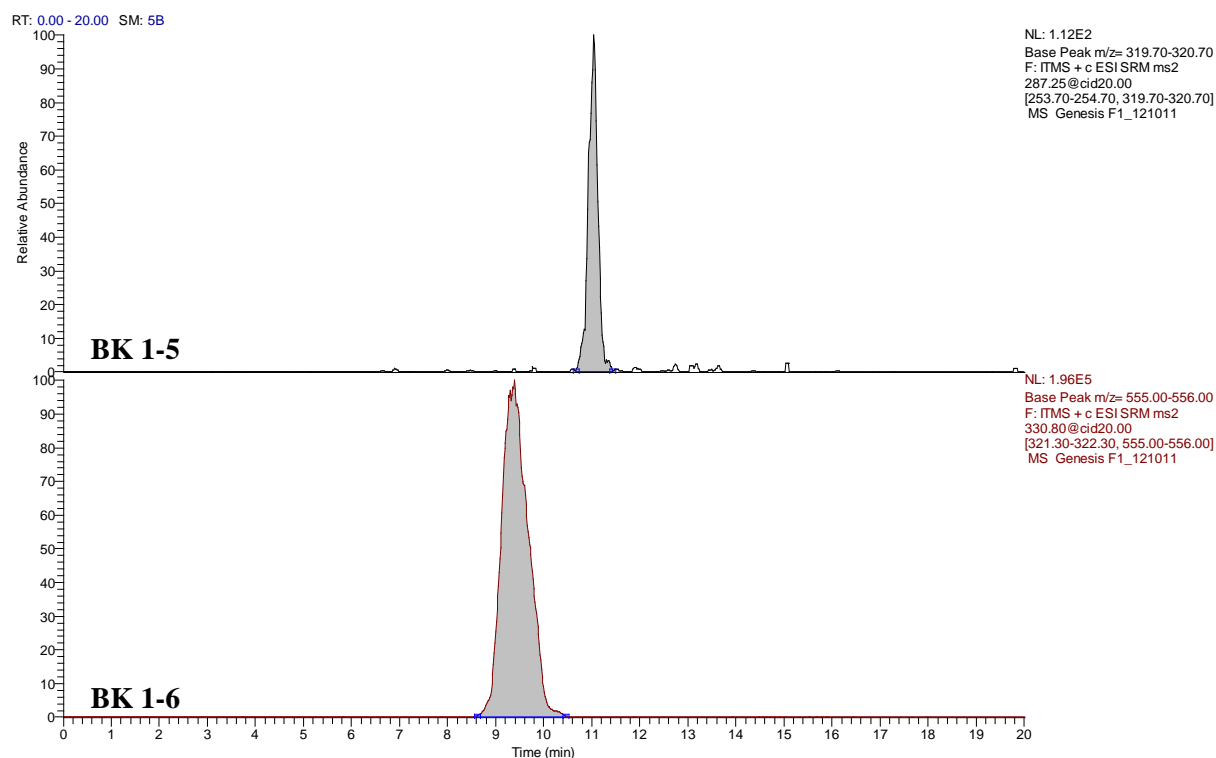


Figur 4-8. BK 1-5 nivået ved langtidsmonitorering av peptidet, med tilsatt DXS. MS-mode: SRM.

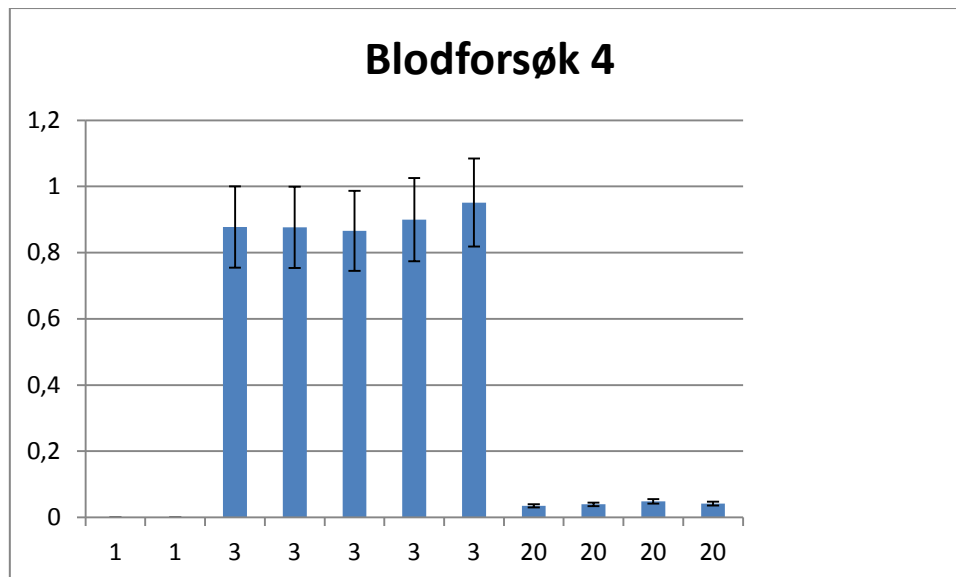
Blodforsøk 4: Blodpose

Analyse av blodposen 3 timer etter tapping viste at relativt lave nivåer av BK 1-5 var til stede (se figur 4-10). Allikevel var disse nivåene altfor høye til å se bort fra (se kromatografisk fremvisning i figur 4-9). I håp om at BK 1-5 nivået i posen ville reduseres over tid, ble posen analysert etter 3 og 20 dager. Analysene viste derimot at BK 1-5 nivået var markant høyere (se figur 4-10) ved dag 3. Blodposen var ikke tilsatt DXS, og plast (som posen er laget av) er en svært dårlig aktivator av kontaktaktiveringssystemet. Det foregår derfor en sakte og langvarig aktivering over tid, noe som gav utslag ved dag 3. Ved dag 20 ble blodposen

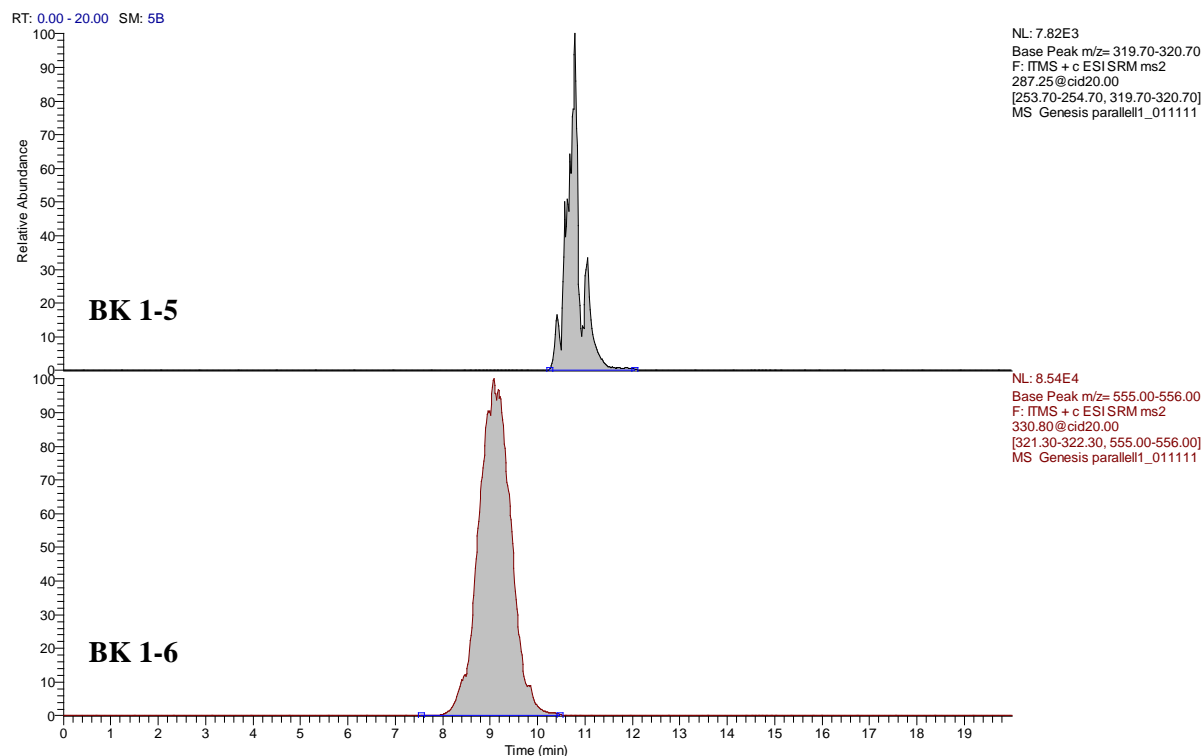
analysert, og det var fremdeles synlige nivåer av BK 1-5 (figur 4-10 og kromatografisk fremvisning figur 4-11).



Figur 4-9. Kromatogrammet fra Blodforsøk 4 (dag 1), hvor BK 1-5 detekteres. Prøveopparbeidelsen startet 3 timer etter blodtaking.



Figur 4-10. BK 1-5/ BK 1-6 intensitetsforholdet ved dag 1, 3 og 20 ved analyse av blodposen. Dag 1 har svært lave verdier i forhold til dag 3 og 20, og det er derfor noe vanskelig å vise disse søylene i figuren. RSD ble beregnet til 14 % på dag 3 og 20.

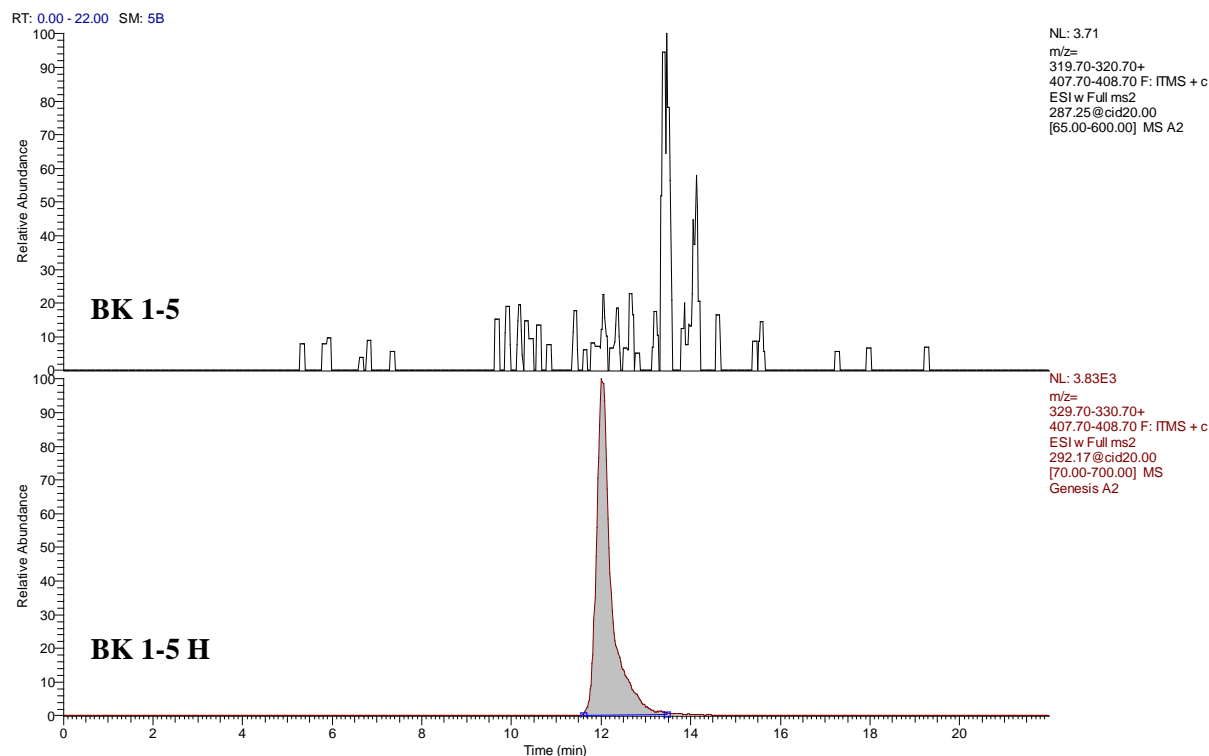


Figur 4-11. Kromatogrammet viser at det fremdeles er til stede BK 1-5 i blodposen etter 20 dager.

Ut i fra disse forsøkene ble det konkludert med at det ikke var mulig å anskaffe blod fritt for endogent BK 1-5 ut fra prøver som inneholdt endogent BK 1-5 ved høye nivåer. Det ble derfor bestemt at standard tilsetning som kalibreringsmetode var beste fremgangsmåte for fullvalidering av metoden. Det viste seg i ettertid at standard tilsetning ikke var nødvendig, da den frivillige som gav blod til valideringen hadde svært lave BK 1-5 nivåer, tilnærmet lik null. Det er sannsynligvis flere årsaker til den forskjellen i BK 1-5 konsentrasjoner blant prøvene testet. Det finnes lite data på endogene nivåer av BK 1-5 hos friske mennesker, men det som er rapportert viser stor variasjon blant populasjonen [5, 41]. Det er derfor ikke overraskende at de frivillige brukt i blodforsøkene hadde ulike endogene nivåer av BK 1-5.

4.3 Validering

Som nevnt i forrige avsnitt ble valideringen og kalibreringen utført på humane blodprøver som ikke inneholdt BK 1-5. Figur 4-12 viser et kromatogram fra blodbatchen som ble brukt til å gjennomføre valideringen. Det kan ses at det ikke er BK 1-5 til stede.



Figur 4-12. Kromatogram av BK 1-5 fra blodbatchen som ble brukt ved valideringen. Ingen BK 1-5 detekteres, kromatogrammet viser kun støy.

4.3.1 Presisjon og nøyaktighet

Tabell 4-1 viser de relative standardavvik for intra- og interdagpresisjon og nøyaktighet ved de tre konsentrasjonsnivåene. Alle konsentrasjonsnivåene på intradag og interdag, tilfredsstiller FDAs krav til presisjon. Metodens nøyaktighet er innenfor veiledende krav, og det kan konkluderes med at metoden viser akseptabel nøyaktighet og presisjon.

Tabell 4-1. Intradag og interdag presisjon, samt nøyaktigheten til metoden.

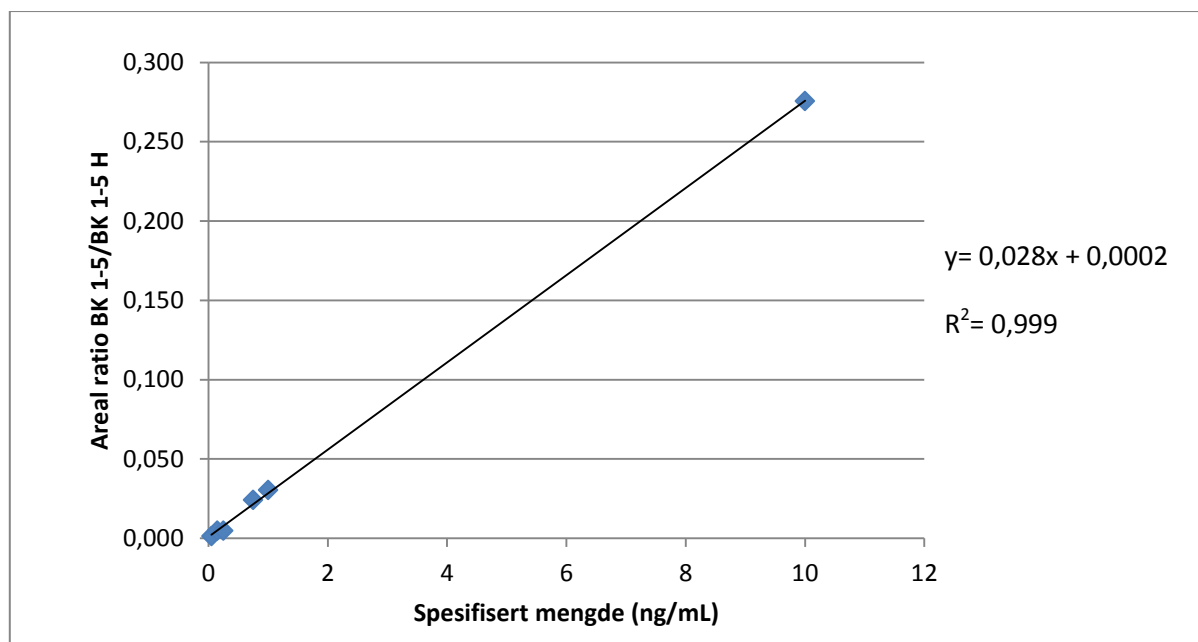
Nivå	Intradag (n=5)	Interdag (n=5)	Prosentvis utbytte i forhold til sann verdi (n=5)
	Presisjon (RSD %)	Presisjon (RSD %)	Nøyaktighet (%)
Lav	13,6 %	20,3 %	109,5 % [*]
Mellom	14,1 %	12,7 %	106,7% [*]
Høy	14,8 %	15,7 %	95,9 % ^{**} (n=2)

^{*} Beregnet fra (nedre) kalibreringskurve B (se punkt 4.3.2)

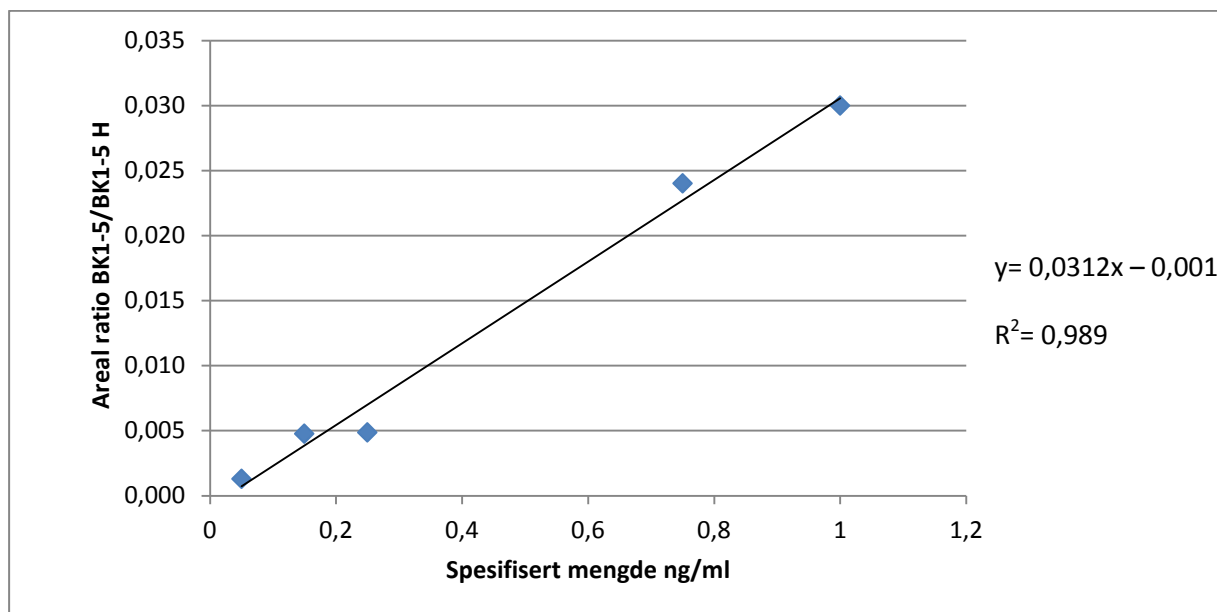
^{**} Beregnet fra kalibreringskurve A (se punkt 4.3.2)

4.3.2 Linearitet

Kalibreringskurven består av et konsentrasjonsområde mellom 50 pg/mL – 10 ng/mL. Da det var usikkert hvor stor BK 1-5 -generering det var å forvente i anfallsprøvene som senere skulle analyseres, ble det valgt å ha med et høyt konsentrasjonsnivå. Ved å ha med punktet på 10 ng/mL, bidrar det svært mye til kurveforløpet, se figur 4-13. Dette innebar at det var store variasjoner blant de laveste konsentrasjonene. Det ble derfor valgt å dele den opprinnelige kalibreringskurven i to, en kalibreringskurve som dekker hele konsentrasjonsområdet (50 pg/mL – 10 ng/mL = A (figur 4-13)), og en kalibreringskurve som dekker nedre del av konsentrasjonsområdet (50 pg/mL – 1 ng/mL = B (figur 4-14)). Det betyr at ved lave konsentrasjoner skal det brukes kalibreringskurven mellom 50 pg/mL og 1 ng/mL. Dette for å få et mer sikkert svar i disse lavere områder.



Figur 4-13. Kalibreringskurve A med konsentrasjonsområde 0,05 ng/mL- 10 ng/mL.



Figur 4-14. Kalibreringskurve B med konsentrasjonsområde 0,05 ng/mL- 1 ng/mL.

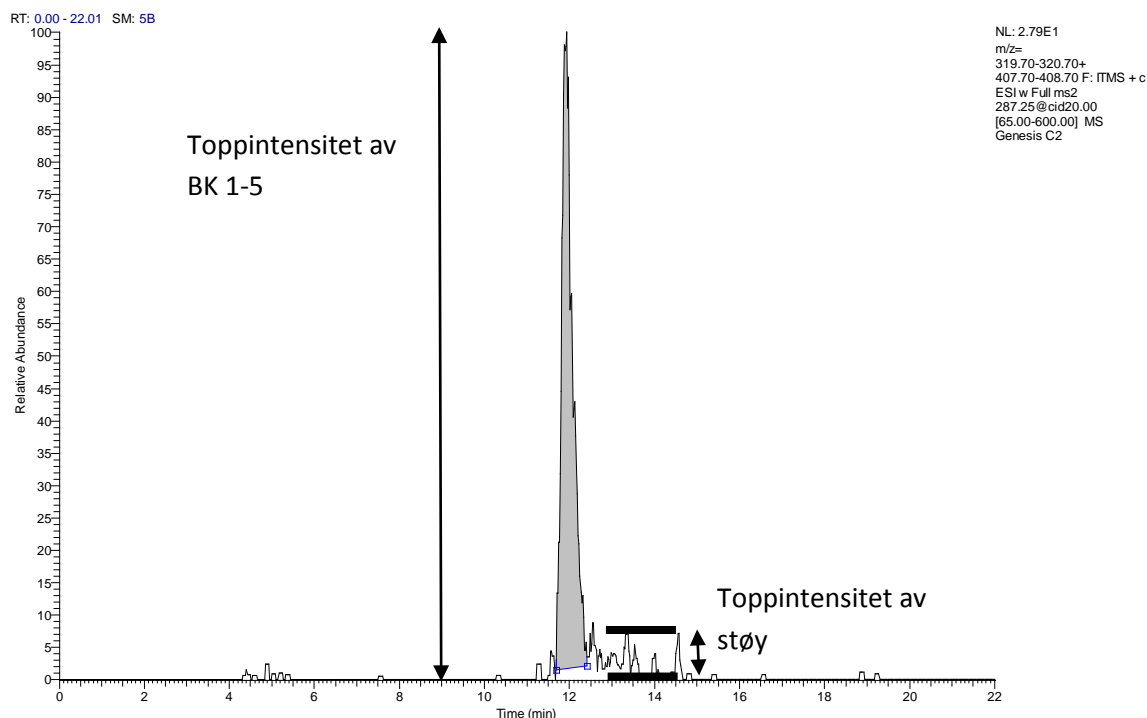
Det er ønskelig med en linearitet så nærme $r^2 > 0,999$ som mulig. Regresjonskoeffisienten ved kalibreringskurven med område 0,05 ng/mL-10 ng/mL er oppgitt til 0,999, mens r^2 til den nedre kalibreringskurven er oppgitt til 0,989. r^2 verdiene for metoden tilfredsstiller kravet til $r^2 > 0,999$, og det kan konkluderes med at metoden viser god linearitet.

4.3.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

For å finne LOD beregnes forholdet mellom topphøydeintensitet ved nest laveste konsentrasjon (0,15 ng/mL) og toppintensitet av støyen (S/N), fra kromatogrammene fra kalibreringskurven. Kravet til S/N er satt til 3. Figur 4-15 viser kromatogrammet av en av parallellene hvor LOD ble estimert ut i fra.

Gjennomsnittlig støynivå lå på 14 % ($\pm 1,05$) ($n=4$) av BK 1-5 toppen (0,15 ng/mL). Dette betyr at den målte konsentrasjonen er omtrent 7 ganger høyere enn målt støynivå eller 2,33 ganger høyere enn LOD. LOD ble dermed estimert til 66 pg/mL.

LLOQ er den laveste analyttkonsentrasjonen som kan bestemmes med en akseptabel presisjon og nøyaktighet. LLOQ ble estimert på samme måte som LOD, men S/N ratiokravet er satt til 10. LLOQ ble estimert til 220 pg/mL. Men siden nivåene på 150 pg/mL i valideringen er innenfor kravet på 20 % repeterbarhet kan 150 pg/mL settes til LLOQ.



Figur 4-15. Estimering av LOD. Kromatogrammet er tilfeldig valgt blant parallellene ved konsentrasjonsnivået 0,15 ng/mL.

4.3.4 Utbytte

Utbytte ble beregnet ved å dividere arealet av BK 1-5 topp i biologisk prøve med arealet av BK 1-5 topp i tilsvarende referanseløsning (n=2). Gjennomsnittlig arealratio er oppført som utbytte, se tabell 4-3. Det er oppnådd relativt høye utbytter ved denne metoden, i forhold til tidligere publiserte data [1, 2]. Det kan være mange årsaker til dette. Utbyttene rapportert av Seip er beregnet ut i fra blod fra gris [2], og det er mulig at komponenter i dyrebloodet kan gi lavere utbytte enn hos mennesker. Å oppnå utbytte over 100 % skyldes trolig variasjonen i MS-systemet. Utbyttene var ikke så stabile som ønsket, og dette henger sammen med at analyse av BK 1-5 og peptider generelt er noe vanskelig. At det høye utbyttet skyldes *ex vivo* generering av BK er lite trolig, da prøvene brukt under dette forsøket er hentet fra samme pool som tidligere forsøkt. Det er tidligere vist at det ikke er BK 1-5 til stede i denne poolen (se starten av 4.3).

Tabell 4-3. Prosentvis utbytte av BK 1-5.

Konsentrasjonsnivå	Prosentvis utbytte av BK 1-5	RSD (%)
0,15 ng/mL	79 %	19 %
0,75 ng/mL	112 %	1 %
10 ng/mL	116 %	12 %

4.3.5 Matrikseffekter

Figur 4-16 viser to analyser fra friske frivillige hvor matrikseffekten ble undersøkt. BK 1-5 H ble injisert via sprøyte under hele analysen av blodprøven, og signalet ble monitorert på t_R der BK 1-5 og BK 1-5 H kommer. Kromatogrammet viser at det ikke ble detektert noen endring i signalet ved retensjonstiden til BK 1-5 og BK 1-5 H. BK1-5 H infusjonssignalet er stabilt igjennom mesteparten av analysen, med noe tegn til nedgang ved slutten av analysen. Dette påvirker derimot ikke signalet av BK 1-5 og interstandarden, og det kan konkluderes med at det ikke er noen forstyrrende komponenter i matrisen som kan påvirke signalet til BK 1-5 og BK 1-5 H. Matrikseffekten ble undersøkt hos 6 friske frivillige og det ble oppnådd tilsvarende resultater ved alle analysene.

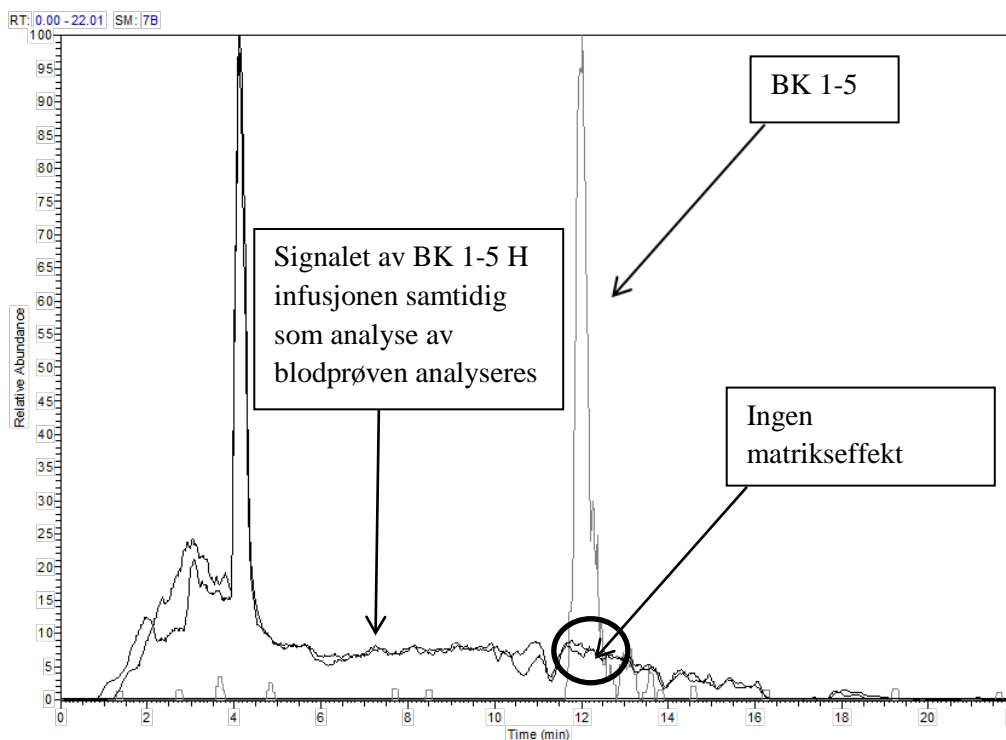


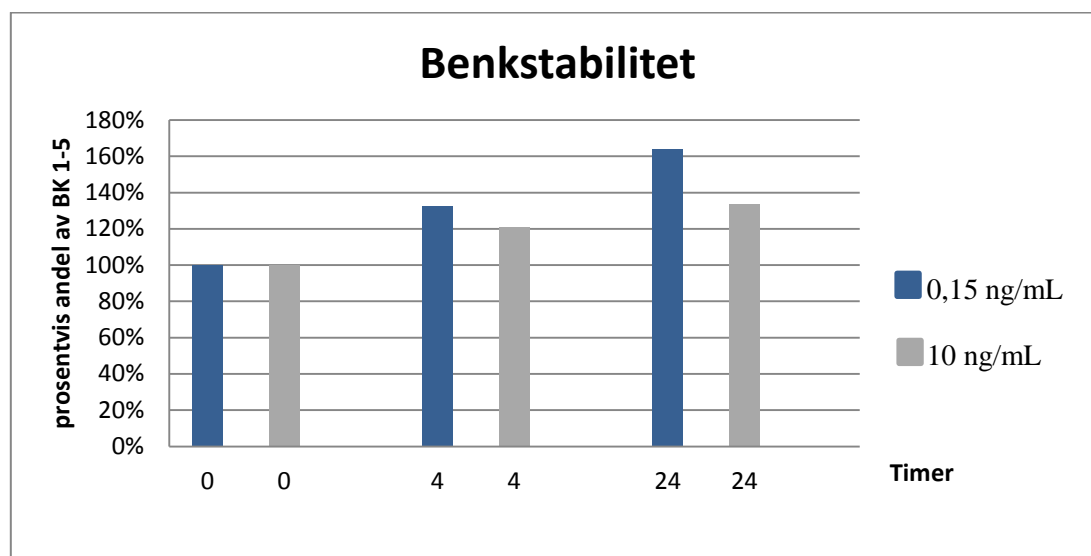
Figure 4-16. Eksempel på 2 analyser av matrikseffektforsøket. Sort linje viser BK 1-5 H infusjon, mens grå linje viser BK 1-5 topp ved 12 min.

4.3.6 Stabilitet

Stabilitetsforsøk ble gjennomført med humant plasma og vandige standarder. Stabiliteten ble undersøkt ved tre nivåer (n=2 eller n=3), ved fire ulike forsøk; benk-, eluat-, frys- og tinstabilitet og autosamplerstabilitet.

Benk (EtOH + blod)

Stabiliteten til BK 1-5 i etanolisk supernatant ble testet som beskrevet i punkt 3.6.4. Ved uforutsette hendelser kan det skje at prøvene blir stående på benk over en lengre tidsperiode. Stabiliteten av BK 1-5 i etanolisk supernatant ble undersøkt og resultatene er presentert i figur 4-17. Konsentrasjonen av BK 1-5 økte over tid, og dette kan skyldes at deler av supernatanten fordampet ved oppbevaring i romtemperatur over tid, og at BK 1-5 dermed ble fordelt i et mindre volum. Prøvene oppnådde ikke det ønskelige kravet på < 15 % avvik fra nullprøvene, og det er med andre ord viktig å gjøre etterbehandling så raskt som mulig for å unngå tap av etanolisk supernatant.

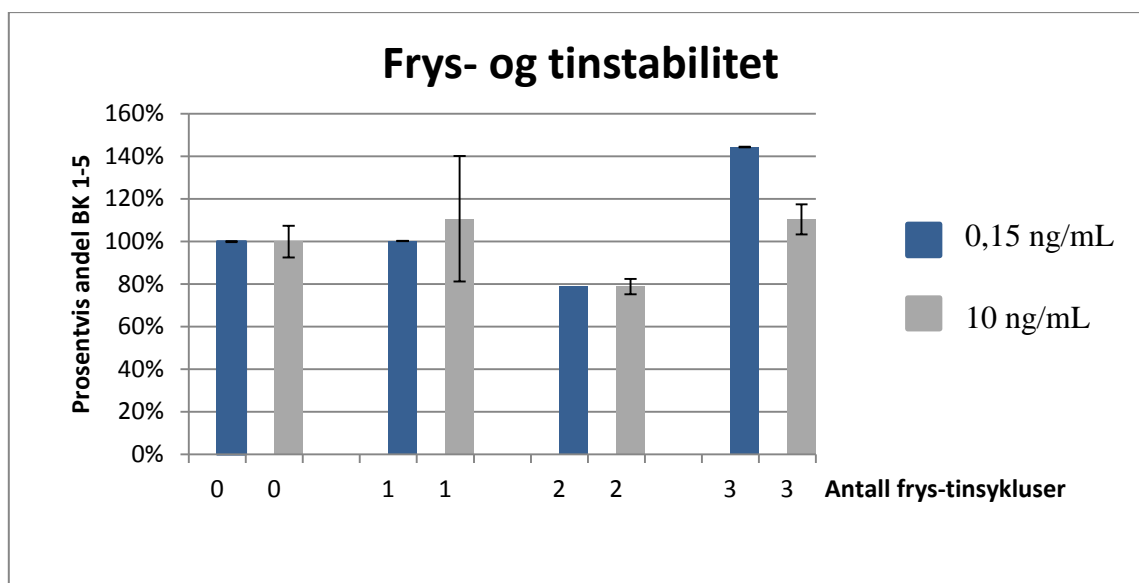


Figur 4-17. Stabiliteten av BK 1-5 (i etanolisk supernatant) ved oppbevaring på benk i 0,4 og 24 timer, med konsentrasjonen 0,15 ng/mL og 10 ng/mL (n= 2).

Frys og tin

Stabiliteten av BK 1-5 ble undersøkt ved 3 frys og tin-sykluser, som beskrevet under punkt 3.6.6, og resultatene er presentert i figur 4-18. Alle prøvene var fryst én gang før forsøket startet, og dette forklarer at nullprøvene og linje 1 (én frysesyklus) er såpass like i resultatene. Økningen ved 10 ng/mL ved linje 1 skyldes trolig variasjon i MS-systemet. Etter 2 frys og

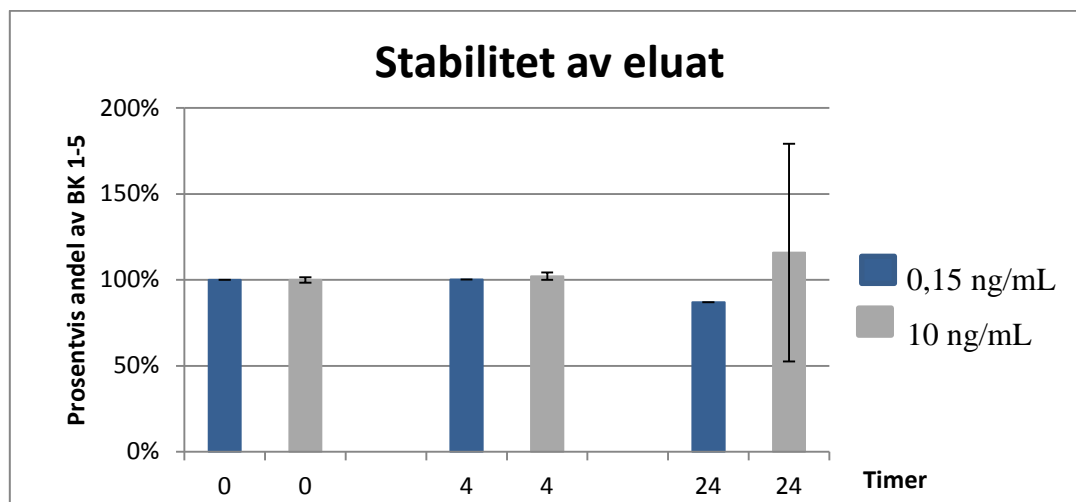
tin-sykluser minker konsentrasjonen av BK 1-5 i prøvene, mens linje 3 prøvene viser en økt konsentrasjon av BK 1-5 etter tre frys- og tin-sykluser. Det er lite trolig at BK 1-5 nivået i prøvene har økt under frysingen, og variasjonen skyldes mest sannsynlig variasjon i MS-systemet. Det kan være ønskelig å undersøke stabiliteten av BK 1-5 under langtidslagring, men dette ble ikke gjort under oppgaven. Da konsentrasjonen av BK 1-5 varierer noe ved gjentatte frys og tin-sykluser, bør det forsøkes å kun fryse prøvene én gang.



Figur 4-18. Stabiliteten av BK 1-5 ved frys-og tinforsøket ($n=3$), med tilhørende standardavvik. Det var ikke datagrunnlag for å beregne standardavviket til syklus 2 ved konsentrasjonen 0,15 ng/mL.

Eluat

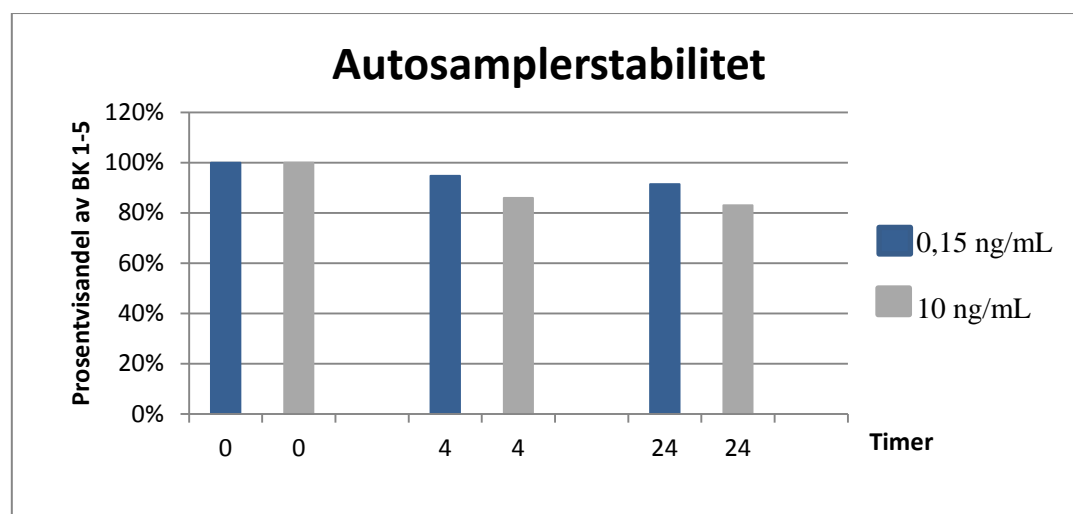
Stabiliteten i eluatet ble undersøkt ved 4 og 24 timer, ved to ulike konsentrasjonsområder (0,15 ng/mL og 10 ng/mL) og sammenlignet med $t=0$. Resultatet viser ingen markant endring etter oppbevaring i romtemperatur i 4 eller 24 timer (se figur 4-19). Nesten alle prøvene innfridde kravet om avvik $<15\%$ fra nullprøvene. 24 timersprøvene med konsentrasjon på 10 ng/mL hadde noe forhøyet BK 1-5 nivå, dette skyldes trolig en variasjon i det analytiske systemet.



Figur 4-19. Stabiliteten til BK i eluatløsningen ved 4 og 24 timer ($n=3$), med konsentrasjonen 0,15 ng/mL og 10 ng/mL.

I autosampler

Det er viktig å teste stabiliteten av BK 1-5 i autosampler. Ved analyse av mange prøver, vil flere prøver bli stående i autosamplern over en lengre periode. Stabiliteten av BK 1-5 i mobilfase ble testet ved 4 og 24 timer, og sammenlignet med prøver laget ved oppstart (nullprøver). Resultatene viste at BK 1-5 har en god stabilitet i autosampler, se figur 4-20. Alle prøvene hadde et avvik som var mindre enn 15 % fra nullprøvene, bortsett fra 24 timersprøvene med konsentrasjon på 10 ng/mL, som hadde et avvik på 17 %. Dette er ikke et problem, men det gjelder å være klar over at stabiliteten ved analyser lengre enn 24 timer kan bli noe dårligere ved høye konsentrasjoner.



Figur 4-20. Stabiliteten til BK 1-5 i autosampler ved 4 og 24 timer ($n=2$) ved konsentrasjonsnivåene 0,15 ng/mL og 10 ng/mL.

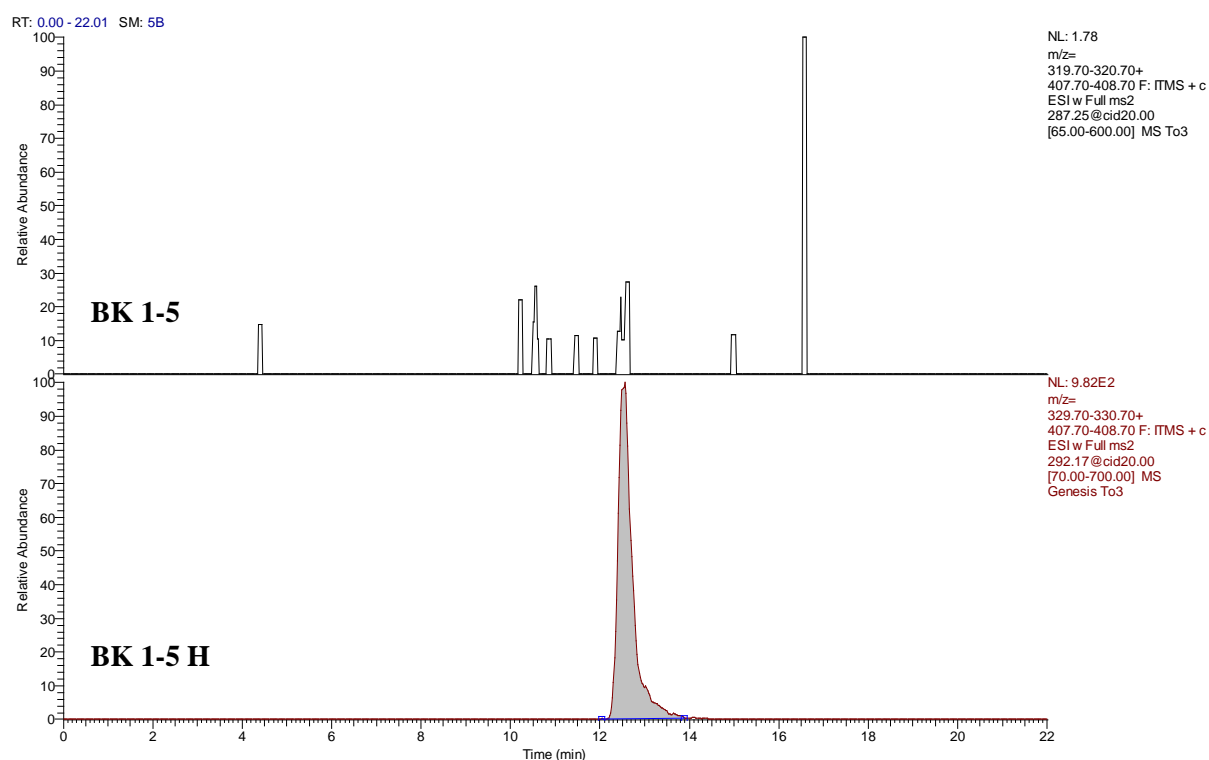
4.3.7 Oppsummering

Den validerte metoden har en akseptabel nøyaktighet og presisjon, og kalibreringskurven (A) viser god linearitet med en r^2 verdi på 0,999. Stabilitetsforsøkene viser at BK1-5 er stabil ved korttidslagring (<24 t) ved både romtemperatur og i autosampler, men det anbefales å opparbeide prøvene så raskt som mulig. Ved gjentatte frys- og tinsykluser kan BK1-5 nivået variere litt, og man bør derfor forsøke å unngå dette.

4.4 Biologiske prøver

4.4.1 Normalprøver

BK 1-5 nivået hos 6 friske frivillige ble undersøkt. Det kunne ikke detekteres BK 1-5 i noen av prøvene. Rapporterte normalnivåer av BK 1-5 er under 50 pg/mL, og dette ligger under estimert LOD for denne metoden [1]. Det var derfor ikke uventet at prøvene ikke inneholdt detekterbar BK 1-5. For kromatografisk fremvisning se figur 4-21.



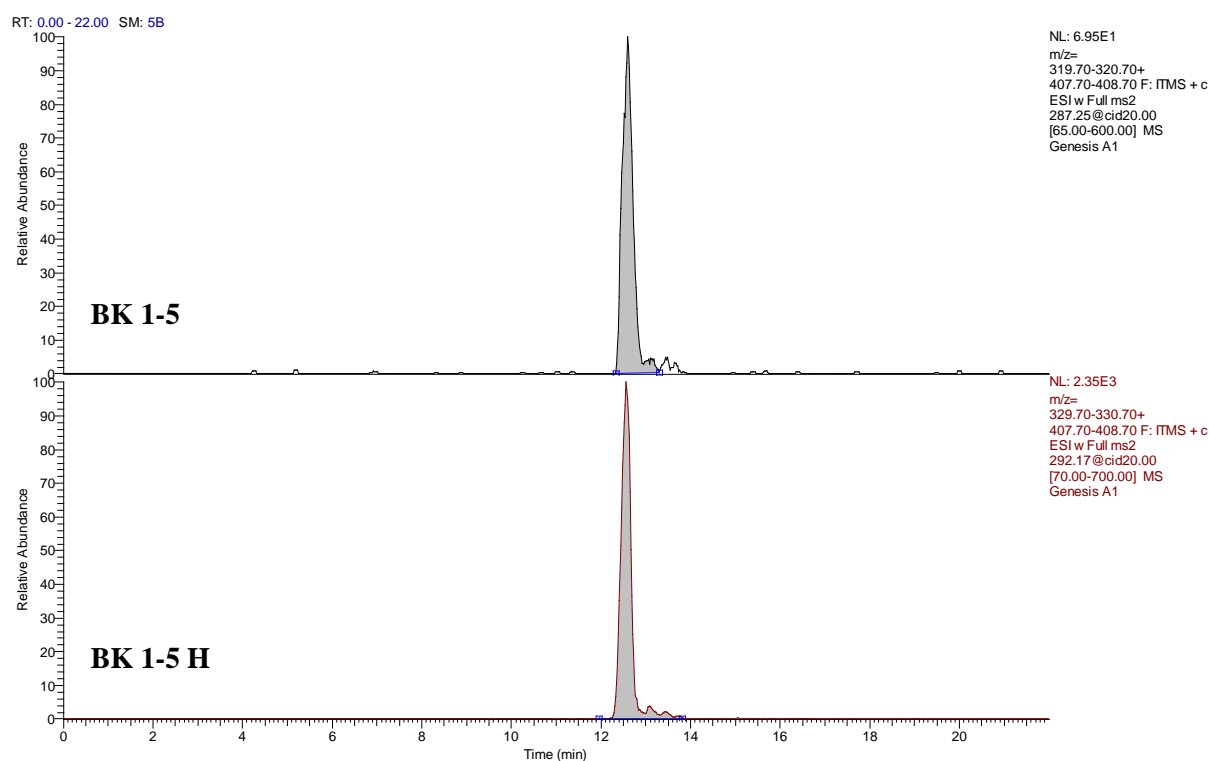
Figur 4-21. Eksempel på kromatogram fra friske frivillige. Det ble ikke detektert BK 1-5, kun støy vises i øverste rute.

4.4.2 Pasientprøver

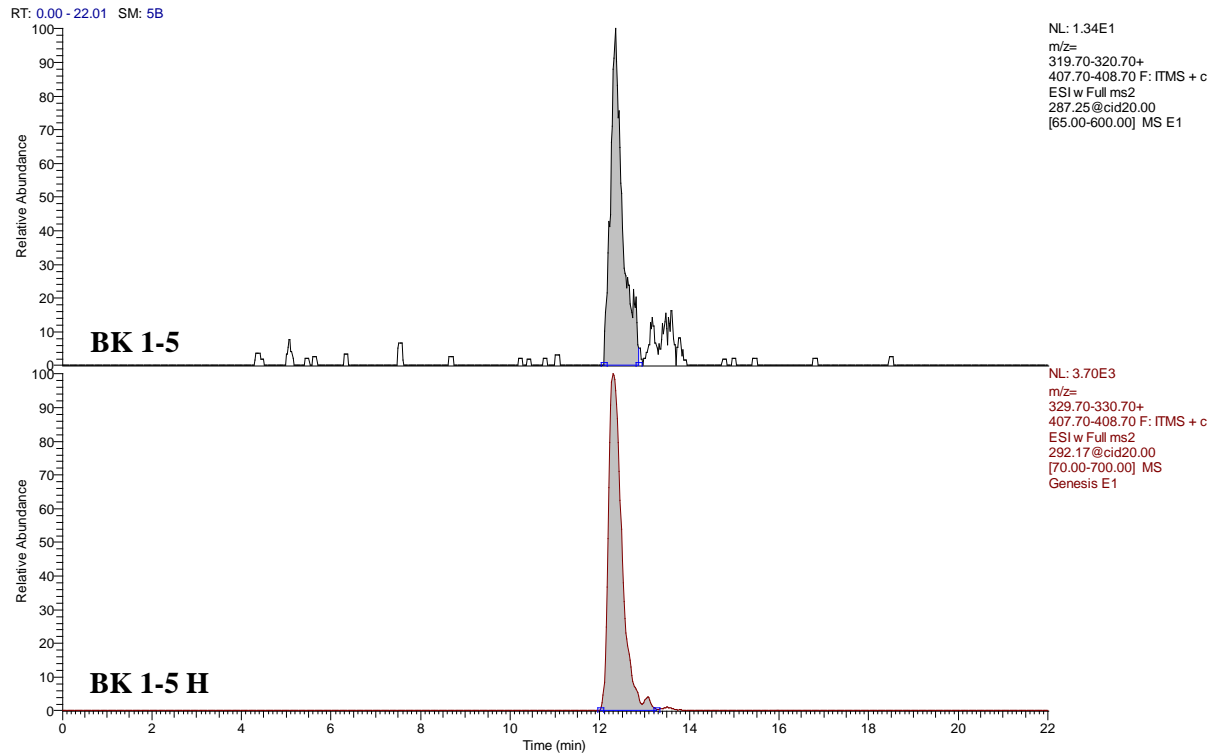
Studien mottok 4 anfallsprøver og 2 kontrollprøver. HAE er en sjelden sykdom, og det var vanskelig å få tak i pasienter til å delta i studien i perioden hvor laboratorieforsøkene pågikk.

Pasient 1

Pasient 1 hadde anfall i venstre arm, og blodprøven ble tatt fra høyre arm da det var vanskelig å finne blodårer ved anfallsarmen. Kontrollprøver fra pasienten ble tatt noen uker etter anfallet. Kromatogrammene viser anfallsprøven og kontrollprøven til pasient 1 (hhv. figur 4-22 og 4-23). Basert på kalibreringskurven ble konsentrasjonen av BK 1-5 i anfallsprøven beregnet, se tabell 4-4. Konsentrasjonsnivået av BK 1-5 ved kontrollprøvene til pasienten ble beregnet til under estimert LLOQ, men klart over estimert LOD på 66 pg/mL. Resultatene av kontrollprøvene til pasient 1 kan derfor ikke kvantifiseres med pålitelig presisjon.



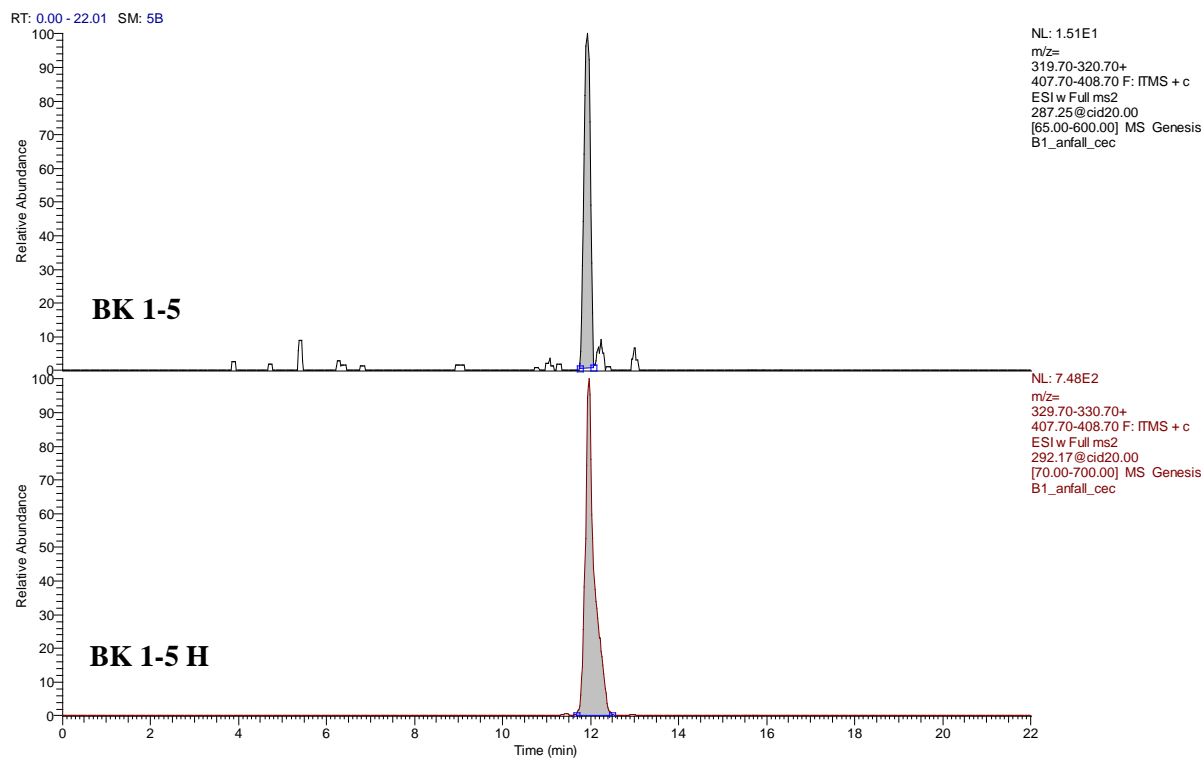
Figur 4-22. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået under anfall hos pasient 1.



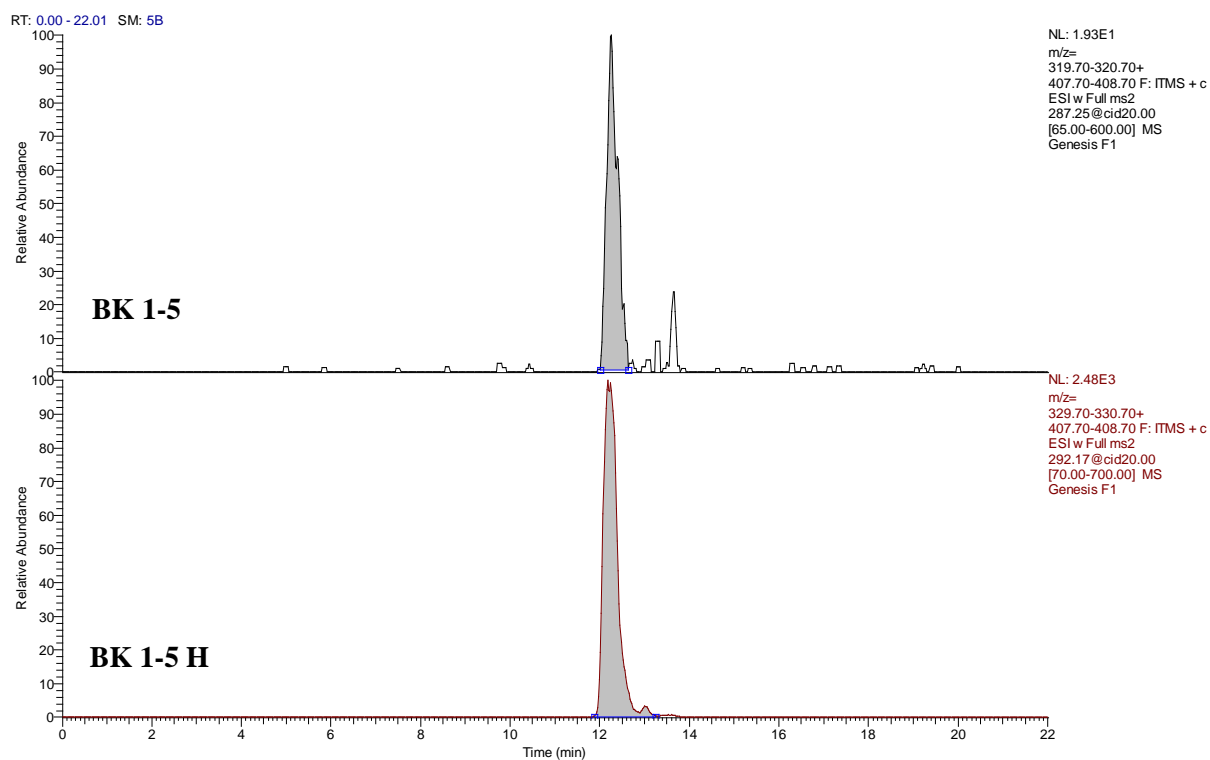
Figur 4-23. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået ved kontroll hos pasient 1.

Pasient 2

Pasient 2 hadde også anfall i venstre arm og blodprøven ble tatt fra høyre arm da det var umulig å finne blodårer i anfallsarmen. Figur 4-24 viser kromatogrammet av anfallsprøven til pasient 2. Kontrollprøver fra pasienten ble tatt noen måneder etter anfallet, og kromatogrammet (figur 4-25) viser BK 1-5 nivået hos pasient 2.



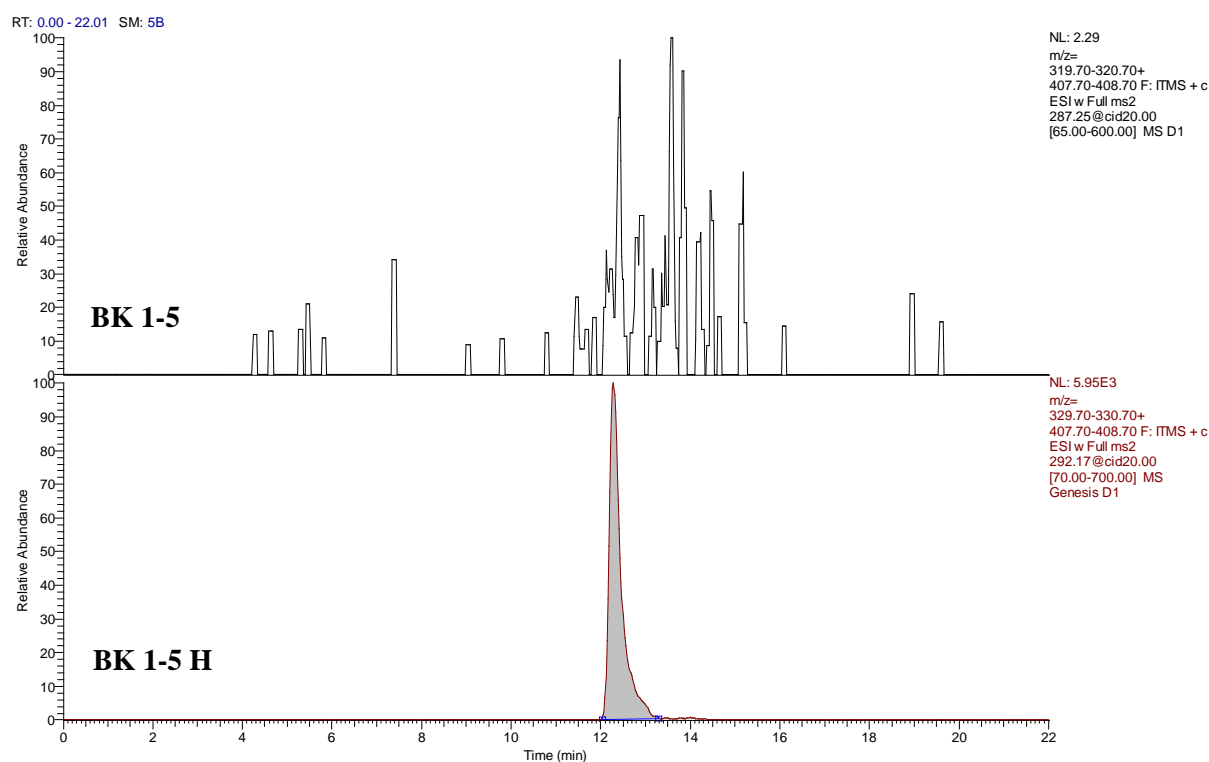
Figur 4-24. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået ved anfall hos pasient 2.



Figur 4-25. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået ved kontroll hos pasient 2.

Pasient 3

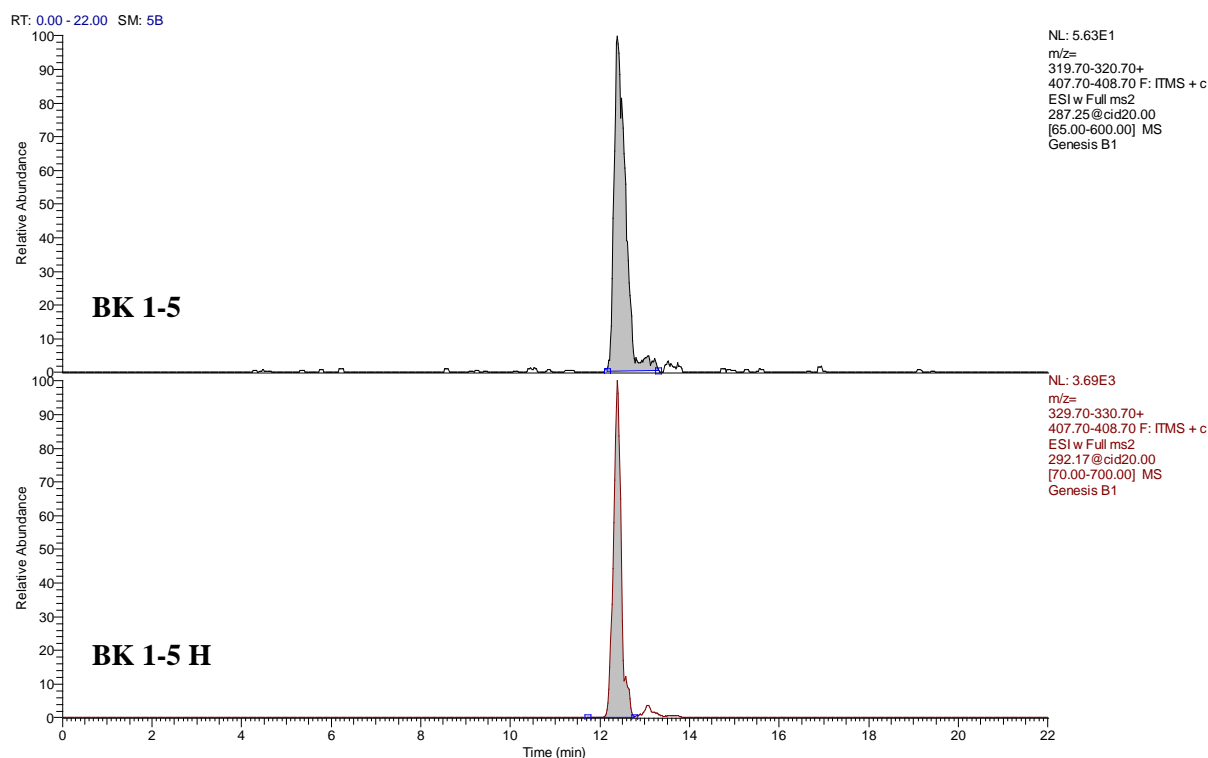
Pasient 3 har en svært aggressiv form av HAE med kontinuerlige anfall, hvor pasienten er avhengig av administrering av Berinert[®] hver tredje dag for å unngå hevelser. Pasienten valgt å utsette administreringen av legemiddelet slik at et eventuelt anfall var på vei. Det ble så tatt en blodprøve av pasienten på dag 3, før legemiddelet ble gitt. Da pasienten tar Berinert[®] hver tredje dag, ble det vurdert at en kontrollprøve ikke var nødvendig. Som kromatogrammet i figur 4-26 viser, ble det ikke detektert BK 1-5 nivåer i blodprøven. Dette kan tyde på at pasienten faktisk ikke hadde et pågående anfall likevel. En annen forklaring kan være at pasienten er så dårlig at depotene av BK i HMWK er uttømt. Denne teorien støtter derimot ikke pasientens sykehistorie, og er derfor lite trolig.



Figur 4-26. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået ved anfall hos pasient 3. Som man ser av kromatogrammet, detekteres ikke BK 1-5, toppene som er til stede er kun støy.

Pasient 4

Pasient 4 hadde anfall i arm og antydning til anfall i mageregionen. Kontrollprøve fra denne pasienten blir tatt etter at denne oppgaven er ferdig. Basert på kalibreringskurven ble konsentrasjonen av BK 1-5 i anfallsprøven beregnet, se tabell 4-4. For kromatografisk fremvisning se figur 4-27.



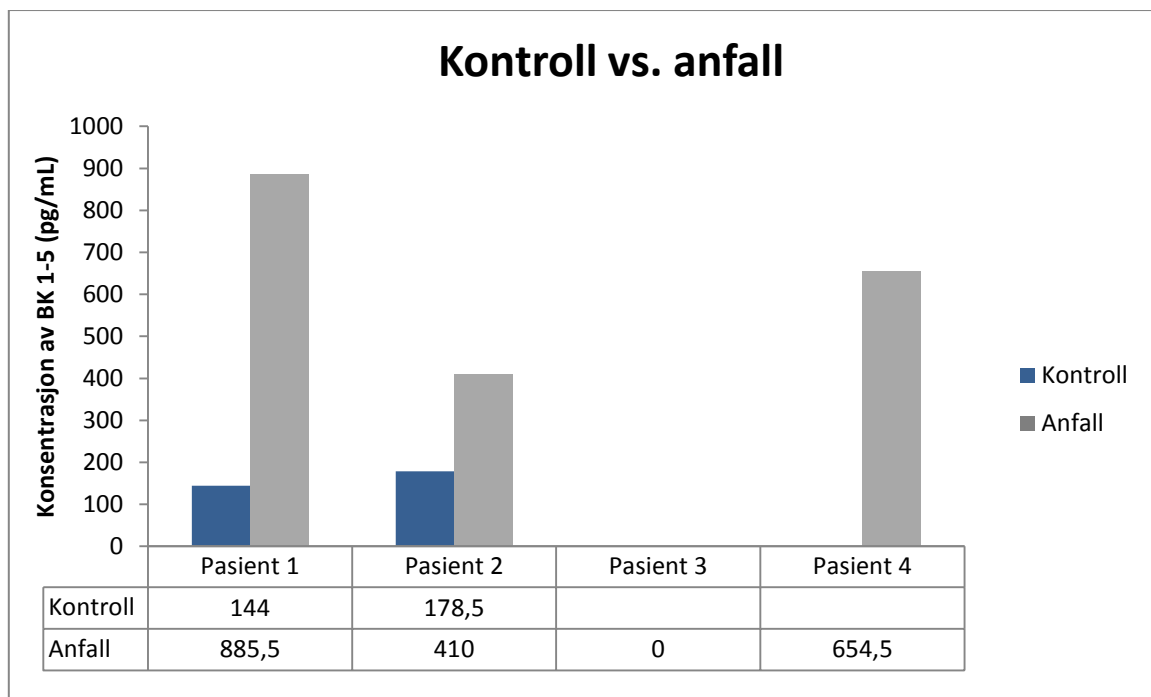
Figur 4-27. Kromatogrammet viser BK 1-5 nivået ved anfall hos pasient 4.

Tabell 4-4. Oversikt over BK 1-5 konsentrasjonene målt i pasientprøvene.

Pasient	Prøve	Konsentrasjon BK 1-5 ved hele kalibreringskurven (ng/mL) (A)		Konsentrasjon BK 1-5 ved bruk av nedre kalibreringskurve (ng/mL) (B)	
		Parallell 1	Parallell 2	Parallell 1	Parallell 2
Pasient 1	Anfall	1,115	0,784	1,032	0,739
Pasient 1	Kontroll	0,102	0,123	0,134	0,154
Pasient 2	Anfall	Feil ved analyse	0,380	Feil ved analyse	0,410
Pasient 2	Kontroll	0,210	0,093	0,231	0,126
Pasient 3	Anfall	Ingen målbar deteksjon		Ingen målbar deteksjon	
Pasient 4	Anfall	0,786	0,593	0,740	0,569

4.4.3 Kontroll vs. anfall

Kontrollprøvene til pasient 1 og 2 viser nivåer som er mye høyere enn BK 1-5 nivået hos friske frivillige (normalprøvene). Dette kan tyde på at HAE-pasienter har en svak, kontinuerlig generering av BK også i anfallsfrie perioder. Sammenlignes kontrollprøvene med anfallsprøvene hos pasientene, ser man en markant økning av BK 1-5 nivået ved anfall (figur 4-28). Dette støtter hypotesen om at bradykinin dannes i store mengder under HAE og derfor er en viktig mediator ved HAE-anfall. Denne observasjonen gjør at bruk av en bradykininantagonist som behandling må være en rasjonell intervensjon som bør kunne kupere et anfall. Statistisk sett er det for begrenset datagrunnlag til å konkludere at teoriene om BK og BK 1-5 ved HAE anfall er riktige, og det er ønskelig med flere pasienter i fremtiden.



Figur 4-28. Gjennomsnittlige BK 1-5 konsentrasjoner til pasientprøvene (pg/mL), beregnet ut i fra kalibreringskurve B. Blanke ruter tilsvarende prøver som ikke er gjennomført.

Funnene ved denne metoden viser ikke så høye konsentrasjonsnivåer som man kanskje forventet, men som tidligere sagt så er det svært lite rapportert av BK 1-5 nivåer ved HAE-anfall. Nussberger *et al.* undersøkte i 1999 BK-konsentrasjonen hos to pasienter med HAE-anfall i den ene armen. Blodprøver ble tatt fra armen med anfall og sammenlignet med blodprøver tatt fra den motsatte armen uten hevelse. Resultatene viste en høyere BK konsentrasjon ved anfallsregionen, enn blodprøvene tatt fra "frisk" arm [42]. Forskjellen av

BK nivået skyldes trolig enzymatisk nedbrytning av BK i lungene, hvor ACE er uttrykt i store mengder. Å måle den systemiske konsentrasjonen av BK 1-5 vil derfor ikke vise den lokale konsentrasjonen av BK 1-5 ved anfallsregionen, og kan gi lavere konsentrasjonsnivåer av BK 1-5 under anfall. Dette kan være en av grunnene til de noe lave konsentrasjonen funnet ved denne metoden.

Ved bruk av nedre kalibreringskurve kan anfallsprøver havne utenfor konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven. Å ekstrapolere over øverste konsentrasjonsnivå kan føre til usikre målinger og bør gjøres med forsiktighet. Ved nye anfallsprøver bør konsentrasjonen først beregnes ut ifra kalibreringskurven som dekker hele området, dvs. fra 50 pg /mL til 10 ng/mL.

4.5 Feilkilder/Ettertanker

Under valideringen ble det brukt 2 paralleller ved flere av forsøkene. På grunn av den store variasjonen blant parallellene, særlig ved lave konsentrasjoner av BK 1-5, burde det ha blitt brukt flere paralleller. På grunn av begrenset prøvemateriale under valideringen, ble det heller ikke analysert kalibreringskurve ved hver analysedag, noe som kunne forbedret nøyaktigheten på konsentrasjonsberegningene.

Manuell integrering av topper kan føre til "feil" ved tolkning av analyseresultater. Det er derfor viktig å være konsekvent ved manuell integrering, slik at variasjonen mellom prøver, operatorer osv. blir minimal. Analyttsignalene i valideringen er beregnet ut i fra topparealet. Ved svært lave konsentrasjoner kan topphøyde være aktuelt å bruke, da areal påvirker presisjonen mer enn topphøyde ved lave konsentrasjoner.

Feilkilde: Oppbevaring av etanol før prøvetaking. Før prøvetakingen skal foregå måles 27 mL etanol opp i rør. Oppbevares rørene i kjøleskap, på is i isoporeske eller frys før prøvetakingen? Temperatur påvirker volumet av etanolen, og det er viktig at det er 27 mL ved prøvetakingen.

5. Konklusjon

Det ble i denne oppgaven videreutviklet, optimalisert og validert en LC- MS/MS metode for bestemmelse av BK 1-5 i humant fullblod. Metoden er basert på Seip (utført i griseblod) og Murphys (utført i humant blod) tidligere arbeid [1, 2], og ble implementert på en lineær ionefelle. Selv om metoden viste muligheten til å måle BK direkte, ble det valgt å fokusere på BK 1-5, siden denne er mye mer stabil.

Metoden ble fullvalidert med følgende valideringsparametere; intradag og interdag presisjon, nøyaktighet, linearitet (deriblant LOD og LLOQ), utbytte, matrikseffekter og stabilitet. Metoden viser akseptabel nøyaktighet og presisjon med en korrelasjonsfaktor på 0,999. LOD ble estimert til 66 pg/mL, mens LLOQ ble satt til 150 pg/mL. Gjennomsnittlig utbytte ble beregnet til 102,3 % ($\pm 10,6$ % RSD). Det ble hverken påvist undertrykking eller signalforsterkning ved retensjonstiden til BK 1-5 signalet. Stabiliteten av BK1-5 ble undersøkt ved ulike trinn i prøveopparbeidelsen og ved analyse, samt ved gjentatte frys- og tinsykluser. Analytten er forholdsvis stabil ved romtemperatur både i etanolisk supernatant og eluat fra SPE, men det anbefales med raskest mulig prøveopparbeidelse. Ved lengre analyser over 24 timer bør man være klar over at autosamplerstabiliteten kan variere, med en observert nedgang på inntil 17 %. Frys-og tinforsøket viste at stabiliteten ved frysing kan variere noe, og det bør derfor unngås å fryse prøvene mer enn én gang.

Pasientprøver og normalprøver fra friske frivillige ble analysert etter valideringen. HAE-pasientene hadde et klart høyere nivå av BK 1-5 utenom anfall ved sammenligning med prøver fra friske frivillige. Ved anfall hos pasientene ble det generert store mengder BK 1-5, og det var synlig forskjell fra kontrollprøvene hos de to pasientene som gav både kontroll- og anfallsprøve. Grunnet begrenset prøvemateriale og få pasienter er det for tidlig å kunne konkludere noe ut i fra pasientprøvene, men resultatene tyder på at det genereres store mengder av BK ved HAE- anfall. Dette støtter teorien og også tidligere funn om at BK er en svært viktig mediator ved HAE-anfall.

6. Litteraturliste

1. Murphey, L.J., et al., *Quantification of BK1-5, the stable bradykinin plasma metabolite in humans, by a highly accurate liquid-chromatographic tandem mass spectrometric assay*. Analytical biochemistry, 2001. **292**(1): p. 87-93.
2. Seip, K.F., *Bestemmelse av Bradykinin 1-5 i fullblod fra gris - Metodeimplementering ved bruk av LC-MS/MS for å bestemme nivået av bradykinin 1-5 i blod fra gris før og etter sepsis*, in *Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet*, 2010, Universitetet i Oslo: Oslo.
3. Caballero, T., *Consensus statement on the diagnosis, management, and treatment of angioedema mediated by bradykinin. Part I. classification, epidemiology, pathophysiology, genetics, clinical symptoms, and diagnosis*. Journal of investigational allergology & clinical immunology, 2011. **21**(5): p. 333-347.
4. Schmaier, A.H., *The plasma kallikrein-kinin system: Its evolution from contact activation*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2007. **5**(12): p. 2323-2329.
5. Murphey, L.J., et al., *Metabolism of bradykinin In vivo in humans: identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite*. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2000. **294**(1): p. 263-269.
6. Kaplan, A.P., *Angioedema*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005. **53**(3): p. 373-388.
7. HAE Norge. *18 spørsmål og svar*. 2005 [cited 2012 26.03.2012]; Spørsmål og svar fra Trine på HAE Norges nettside.]. Available from: <http://www.haenorge.net/cgi-bin/index.cgi?action=viewnews&id=2>.
8. Cicardi, M. and A. Zanichelli, *Angioedema due to C1 inhibitor deficiency in 2010*. Internal and emergency medicine, 2010. **5**(6): p. 481-486.
9. Kaplan, A.P., *Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: The role of C1 inhibitor therapy*. Journal of allergy and clinical immunology, 2010. **126**(5): p. 918-925.
10. Levy, J.H., *The therapeutic potential of a kallikrein inhibitor for treating hereditary angioedema*. Expert opinion on investigational drugs, 2006. **15**(9): p. 1077-1090.
11. Pappalardo, E., *Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: Functional and structural correlates*. Molecular immunology, 2008. **45**(13): p. 3536-3544.
12. Davis Iii, A.E., *Mechanism of Angioedema in First Complement Component Inhibitor Deficiency*. Immunology and allergy clinics of North America, 2006. **26**(4): p. 633-651.
13. Frank, M.M., *Hereditary Angioedema: The Clinical Syndrome and its Management in the United States*. Immunology and allergy clinics of North America, 2006. **26**(4): p. 653-668.

14. Moellman, J., *Diagnosis and Management of Hereditary Angioedema: An Emergency Medicine Perspective*. The journal of Emergency Medicine, 2012.
15. Craig, T.J., et al., *C1 esterase inhibitor concentrate in 1085 Hereditary Angioedema attacks--final results of the I.M.P.A.C.T.2 study*. Allergy, 2011. **66**(12): p. 1604-1611.
16. Legemiddelverk, S. *Preparatomtale Firazyr*. 2009 18.04.2011 [cited 2012 27.03]; Available from:
http://www.slv.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=495e86b6-596d-4584-a57b-099935325a60#SPCHUMAN_05.
17. Lumry, W., et al., *Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B₂ receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial*. Annals of allergy, asthma, & immunology, 2011. **107**(6): p. 529-537.
18. Rang, H.P., et al., *Rang and Dale's Pharmacology*. 6th ed2007: Churchill Livingstone Elsevier.
19. Rang, H.P., *Structure of bradykinin and some bradykinin antagonists*, F.S.o.b.a.s.b. antagonists.bilde, Editor 2006, Churchill Livingstone Elsevier: Rang and Dale's Pharmacology.
20. Kaplan, A.P., *Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease*. Journal of allergy and clinical immunology, 2002. **109**(2): p. 195-209.
21. Campbell, D.J., *The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems*. International journal of biochemistry & cell biology, 2003. **35**(6): p. 784-791.
22. Skidgel, R.A., *Bradykinin-degrading enzymes: Structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1992. **20**(SUPPL. 9).
23. Ferreira, S.H., *The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat*. British Journal of Pharmacology, 1967. **30**(2): p. 417-424.
24. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
25. Leksikon, S.N. *Blod*. 2012 [cited 2012 15.04]; Available from: <http://snl.no/blod#menuitem0>.
26. Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Vol. Third Edition. 2010, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
27. Ermer, J., *Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis*. Biomedical chromatography, 2000. **14**(6): p. 373-383.
28. Niessen, W.M.A., *Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. Journal of chromatography. A, 2003. **1000**(1-2): p. 413-436.
29. Covey, T.R., *Atmospheric pressure ion sources*. Mass spectrometry reviews, 2009. **28**(6): p. 870-897.

30. Reubsaet, L., *Basics in LC-MS*, in *Kompendium til FRM 5310*, F. Institutt, Editor 2011, Universitetet i Oslo.
31. Scientific, T.F., *LTQ Series Hardware Manual*, 2009.
32. Glish, G.L., *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature reviews. Drug discovery, 2003. **2**(2): p. 140-150.
33. Kicman, A.T., *An introduction to mass spectrometry based proteomics-Detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007. **260-262**: p. 212 -227.
34. Agency, E.M. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011 [cited 2012 09.04]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
35. U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. 2001 [cited 2012 09.04]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
36. Ewles, M., *Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC-MS/MS*. Bioanalysis, 2011. **3**(12): p. 1379-1397.
37. Taylor, P.J., *Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. Clinical biochemistry, 2005. **38**(4): p. 328-334.
38. Cappiello, A., *Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2010. **33**(9-12): p. 1067-1081.
39. Landrø, L., *Prosjektgodkjenning av prosjektet "Bradykinin-utløste angioødemer"*, 2011, Universitetssykehuset i Oslo.
40. Landrø, L., *Pasientinformasjon om studien "Bradykinin-utløste angioødem"*, 2011, Universitetssykehuset i Oslo.
41. Pellacani, A., *Antagonizing and measurement: Approaches to understanding of hemodynamic effects of kinins*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1992. **20**(SUPPL. 9).
42. Nussberger, J., *Local bradykinin generation in hereditary angioedema*. Journal of allergy and clinical immunology, 1999. **104**(6): p. 1321-1322.

7. Vedlegg

7.1 Vedlegg 1: Protokoll

Protocol

22. March 2011

"Study of hereditary angioedema and other bradykinin mediated angioedemas"

Background:

Researchers and physicians in Norway have been interested in hereditary angioedema (HAE) for more than twenty years. The publication of a thesis on HAE on the web in 1996 was one of the earliest at the time (http://ansatte.uit.no/erikwn/hae/Thesis/thesis_in_english.htm). The thesis described plans for exploring the efficacy of HOE-140 (icatibant) in HAE in collaboration with Hoechst.

We have participated in European Network for HAE (Cleopatra) and a European Union concerted action on Hereditary angioedema; Novel Methods For Predicting Preventing And Treating Attacks In Patients With Hereditary Angioedema (PREHAEAT). The project was lead by Professor Marco Cicardi, Milano, Italy. Recently we have co-authored international review articles on HAE (1), and consensus reports (2).

Effects of adding supraphysiological doses of C1-Inhibitor in various conditions have been investigated (3-6). A porcine model of experimental sepsis was set up (7). The massive capillary leakage observed in the septic pigs led us to believe bradykinin was involved. As bradykinin degrades in seconds, reliable and doable methods for measuring bradykinin are needed. We have therefore established an advanced assay for detecting a longer living split-product of bradykinin; Arg-Pro-Pro-Gly-Phe = BK1-5, by a modification of a method described by Murphey et al (8). Briefly, we use a Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method. This is an analytical chemistry technique that combines the physical separation capabilities of liquid chromatography (or HPLC) with the mass analysis

capabilities of mass spectrometry. BK1-6 is used as internal standard. Icatibant concentration is also measured.

So far, we have preliminary results obtained from human and porcine blood samples, but a final evaluation is remaining. The LC-MS/MS-instrument is costly and reliable results depend on skilled staffing. Also in humans bradykinin levels are difficult to interpret, and measurements rely on a few experiments. E.g. Nussberger et al, who found bradykinin levels in HAE patients and in ACE-induced angioedema patients to be 12x higher than normal, but under 50 fmol/ml (9). On the other hand, severe traumatic brain injury resulted in 34 700 fmol/ml of the metabolite BK1-5 according to the review by Murphey et al. (Obviously, there is a need for a more reliable determination of bradykinin exposure in health and disease, which is the main reason for our project.

Research group:

The Department of Dermatology at The National Hospital of Norway has newly decided to make bradykinin-induced angioedema one of its major research interests. The Department plans to invite and fund one dermatologist in a 50% post doc research position.

Members are:

Scientific leader: Erik Waage Nielsen. MD. PhD. Professor. University of Tromsø and Nordland. Bodø.

Administrative leader: Per Helsing. MD. Senior Dermatologist.

Post doc researcher: Linn Landrø- MD. Dermatologist. Thesis dissertation 2011.

Medical genetiscist: Ketil Heimdal. MD. PhD. Consultant in clinical genetics.

Ear Nose Throat specialist: Ralph Dollner. Senior consultant.

Professor Harald Thidemann Johansen. School of Pharmacy, University of Oslo.

Ph.D Student, Master of Pharmacy, Knut Fredrik Seip. School of Pharmacy, University of Oslo.

Ph.D Student, Master of Pharmacy, Kari Christiane Bjerknes. School of Pharmacy, University of Oslo.

Professor Leon Reubsaet. School of Pharmacy, University of Oslo.

All above addresses are in Norway.

Collaborators: Christian Drouet, Full Prof, Université Joseph Fourier. Centre de Référence des Angioedèmes Hôpital A Michallon, CHU Grenoble, BP 217, F-38043 Grenoble France

Aims of study:

1. Establish a patient Database within one year including Quality-of-life research in angioedema patients.
2. Establish a 24h/365 d outpatient clinic with blood sampling service at the National Hospital (Rikshospitalet) for acute attack patients.
3. Explore the mutational spectrum and phenotypes in Norwegian families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency in collaboration with Christian Drouet, Grenoble (10). Prepare for the identification of new genes in HAE in C1INH-gene mutation negative families.
4. Determine concentrations of bradykinin in human and porcine samples in order to ascertain reliable reference values for several disease states as well as to find normal reference values.
5. Diagnose and investigate patients with angioedema resistant to conventional anti-allergic treatment. We will study blood during angioedema attacks and possibly tissue biopsies from localized edema. These patients fall into different groups:
 - a. Patients with normal C1-Inhibitor
 - i. Gain-of-function FXII-mutation
 - ii. Cause unknown (increased bradykinin-production, decreased bradykinin breakdown, increased sensitivity to bradykinin)
 - b. Angiotensin converting enzyme inhibitor-induced angioedema

- c. Angiotensin II-receptor blocker-induced angioedema
- d. Angioedema from new anti-diabetic drugs (Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors) (11).
- e. Other patients

Methods:

1. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for detecting BK1-5 and icatibant.
2. Expand the LC-MS/MS-method to detect bradykinin
3. Measure bradykinin by ELISA-techniques
4. Detect bradykinin liberation by indirect methods:Immunoblot of the various High Molecular Weight Kininogen molecules resulting from liberation of bradykinin
5. Various molecular DNA-techniques (10).

Bibliography:

1. Bowen T, Cicardi M, Bork K, Zuraw B, Frank M, Ritchie B, et al. Hereditary angiodema: a current state-of-the-art review, VII: Canadian Hungarian 2007 International Consensus Algorithm for the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Jan;100(1 Suppl 2):S30-S40.
2. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al. 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010;6(1):24.
3. Nielsen E, Mollnes T, Harlan J, Winn R. C1-Inhibitor Reduces the Ischaemia-Reperfusion Injury of Skeletal Muscles in Mice after Aortic Cross-Clamping. *Scand.J Immunol.* 2002 Dec;56(6):588-592.
4. Thorgersen E, Ludviksen J, Lambris J, Sfyroera G, Nielsen E, Mollnes T. Anti-inflammatory effects of C1-Inhibitor in porcine and human whole blood are independent of its protease inhibition activity. *Innate.Immun.* 2010;16(4):254-264.

5. Thorgersen E, Ghebremariam Y, Thurman J, Fung M, Nielsen E, Holers V, et al. Candidate inhibitors of porcine complement. *Mol.Immunol.* 2007 Jan;44(1-3):182.
6. Salvesen B, Nielsen E, Saugstad O, Mollnes T. C1-inhibitor is an Efficient Inhibitor of Meconium-induced Complement Activation and Cytokine Formation. Abstract. The Pediatric Academic Societies (PAS) Annual Meeting May, 2008 [Internet]. 2007;Available from: /Users/EWN/Documents/Arkiv_artikler/6600_6699/6653.pdf
7. Nielsen E, Hellerud B, Thorgersen E, Castellheim A, Pharo A, Lindstad J, et al. A new dynamic porcine model of meningococcal shock. *Shock.* 2009 Jan 19;32(3):302-309.
8. Murphey L, Hachey D, Vaughan D, Brown N, Morrow J. Quantification of BK1-5, the stable bradykinin plasma metabolite in humans, by a highly accurate liquid-chromatographic tandem mass spectrometric assay. *Anal.Biochem.* 2001 May 1;292(1):87-93.
9. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet.* 1998 Jun 6;351(9117):1693-1697.
10. Bygum A, Fagerberg CR, Ponard D, Monnier N, Lunardi J, Drouet C. Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy.*
11. Brown NJ, Byiers S, Carr D, Maldonado M, Warner BA. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor Use Associated With Increased Risk of ACE Inhibitor-Associated Angioedema. *Hypertension.* 2009 7;54(3):516-523.

7.2 Vedlegg 2: Informert samtykkeskjema

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

”Studie av hereditært angioødem og andre bradykinin-utløste angioødemer”

Bakgrunn og hensikt

Dette er et spørsmål til deg om å delta i en forskningsstudie for å undersøke hvorfor det oppstår hevelser i hud og slimhinner hos en gruppe pasienter med angioødem. Du er valgt ut til denne studien fordi du har tilbakevendende hevelser i hud og/eller slimhinne.

Årsaken til dette kan være hereditært (arvelig) angioødem, hvor det foreligger en forandring i et gen (C1-inhibitor genet eller SERPING1). Forandringen kan gi redusert funksjon av C1-inhibitor, som igjen medfører økte mengder av et stoff som kalles bradykinin, som påvirker karsengen med påfølgende væskelekkasje. Andre årsaker kan være omsetningen i kroppen av bradykinin, igjen med væskelekkasje fra blodårene og ødem (hevelse) som resultat. Enkelte medikamenter kan også påvirke omsetningen av bradykinin.

Studien vil bli gjennomført av en forskningsgruppe (BRAKUTAN) hvor de fleste arbeider ved Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet og ved Universitetet i Oslo.

Hva innebærer studien?

Studien innebærer at vi vil ha en strukturert samtale med deg for å kartlegge omfang og alvorlighetsgrad av plagene dine, og vi vil be deg om en blodprøve tatt under anfall med hevelser, og også en liten vevsprøve tatt i lokalbedøvelse av hud med hevelse. Vevsprøven kan også utelates hvis du ønsker det.



I forbindelse med studien vil det bli etablert et utvidet helsetilbud med egen poliklinikk (med kontaktlege/sykepleier), slik at du lettere kan få hjelp i akutte situasjoner med alvorlige hevelser. Din deltakelse i denne studien vil ikke være nødvendig for å inngå i dette tilbudet.

Mulige fordeler og ulemper

Etablering av egen poliklinikk og forskningsaktivitet vil komme alle pasienter med angioødem til gode, i det behandlingstilbudet og kunnskapsnivået bedres. Vi vil søke å finne forandringen i C1-inhibitor genet hos pasienter med arvelig angioødem. Pasienter som deltar vil få informasjon om de genetiske funnene som er gjort, og får tilbud om genetisk veiledning etter vanlige lover og regler innen helsevesenet. En påvist genetisk årsak vil kunne bidra til rask avklaring hos små barn med uklar årsak til magesmerter eller hevelser, idet blodprøver kan være vanskelig å tolke hos små barn.

Dersom studien greier å påvise årsaken til at enkelte medikamenter påvirker omsetningen av bradykinin, kan man på forhånd en mulighet for å undersøke om pasienter har risiko for alvorlige hevelser under behandling med medikamentet. Etablering av målemetoder for bradykinin vil være av stor betydning, fordi man på denne måten vil kunne skille hevelser forårsaket av bradykinin fra hevelser forårsaket av histamin (urtikaria/elveblest), og hvor behandlingen er en helt annen.

Deltakelse i en studie innebærer noe tidsbruk og i denne studien blodprøve og mulig vevsprøve, som kan oppleves ubehagelig. De fleste pasienter vil bli inkludert i forbindelse med anfall hvor man likevel er i behov av legehjelp, og den beste hjelp vil du sannsynligvis få hos oss. Vi tror derfor ikke studien vil innebære særlige ulemper for deg som pasient.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste.

Det er kun autorisert personell knyttet til prosjektet som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg. Koblingen mellom blodprøven din og deg vil bli slettet når studien er



over, men prøvematerialet vil bli beholdt anonymisert (uten personopplysninger tilknyttet). Informasjonen om deg (anfallshyppighet, alvorlighetsgrad av anfall samt behandling) som er lagret i en forskningsdatabase, vil bli søkt omgjort til et helseregister som er å regne som en del av din journal. Disse opplysningene vil fortsatt kun være tilgjengelig for de legene som har ansvar for pasientgruppen med angioødem.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Vår gruppe er med i et europeisk samarbeidsprosjekt for å bedre forebyggelse og behandling av arvet angioødem. Prosjektet støttes av EU. Vi vil be deg om tillatelse til å dele en del av opplysningene i spørreskjemaet med leger og forskere i den internasjonale samarbeidsgruppen. Hvis du gir tillatelse til dette, er det opplysninger knyttet til sykdommen som vil være aktuelle å utveksle; personopplysninger som navn, personnummer og adresse vil ikke bli registrert (avidentifiserte opplysninger).

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dette vil ikke få konsekvenser for din videre behandling. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke uten at det påvirker din øvrige behandling. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte dr Linn Landrø ved Hudavdelingen, Oslo Universitetssykehus, tlf 23070000.

Ytterligere informasjon om studien finnes i kapittel A – utdypende forklaring av hva studien innebærer.

Ytterligere informasjon om biobank, personvern og forsikring finnes i kapittel B – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.

Samtykkeerklæring følger etter kapittel B.

Kapittel A- utdypende forklaring av hva studien innebærer

- Deltakere i denne studien vil være personer med hevelser i hud og/eller slimhinner, hvor vi mistenker at årsaken er økt mengde bradykinin i blodet. Dette er tilfellet ved arvelige former for angioødem, og sannsynligvis ved en del andre former for angioødem, blant annet medikamentutløste varianter.

Mange pasienter plages med angioødem og elveblest, og disse pasientene vil ikke være aktuelle for denne studien, fordi hevelsene ved denne tilstanden er forårsaket av et annet stoff som kalles histamin.

- Studien har flere målsetninger, blant annet å etablere en målemetode som kan skille de forskjellige formene for angioødem fra hverandre. Det er viktig for å kunne stille riktig diagnose og kunne velge rett behandling. Videre ønsker vi å kartlegge årsakene til at økte mengder bradykinin finnes i blodet, gjennom undersøkelse av aktuelle gener for de arvelige variantene, og se hvordan bradykinin omsettes hos personer som ikke har en klar arvelig disposisjon for angioødem.
- Pasienter som ikke velger å delta i studien vil få samme behandling som de har fått tidligere. Sannsynligvis vil tilbudet for alle oppleves som bedre, da det opprettes eget poliklinisk tilbud med kontaklege og sykepleier. Nye pasienter med angioødem vil bli utredet som tidligere, ofte blir det å forsøke ulike former for behandling, da en ikke sikkert kjenner årsaken til angioødemet. For de arvelige variantene er utredningen og behandlingen den samme om en velger å være med eller ikke.
- Deltakere vil gå gjennom et strukturert intervju/spørreskjema for å kartlegge type, alvorlighetsgrad og hyppighet av anfallene. Vi vil be om blodprøve under anfall, og også en vevsprøve av hevelse dersom det ligger til rette for det. Vevsprøve vil ikke bli etterspurt om hevelsene sitter i ansiktet.

”Studie av areditært angioødem og andre bradykinutkløste angioødemer”. 1. februar 2011

- Intervju og prøver vil fortrinnsvis bli tatt i forbindelse med anfall. Deltakere som har takket ja til invitasjonen, men som har sjeldent anfall, vil sannsynligvis bli ringt opp for intervju slik at kartleggingen av anfall kommer på plass så tidlig som mulig. Vi regner med at dette vil skje i løpet av høsten 2011, eller våren 2012.
- Fordelen ved å delta i en slik undersøkelse er tilbudet for pasienter med angioødem blir bedre. Egen poliklinikk med kontaktpersoner har lenge vært et ønske fra pasientene, som tidligere har måttet besøke legevakt under anfall. Økende kunnskap ervervet gjennom forskning er selvsagt også et gode. Dersom målemetoden for bradykinin viser seg å kunne etableres i klinikken, vil utredningen av pasienter med angioødem bli bedre, med raskere avklaring av årsak og raskere målrettet behandling.
- Vi mener deltakelse i denne studien ikke skal medføre særlig risiko for bivirkninger eller ulempe. I den grad det er mulig vil intervjuer og prøver bli tatt i forbindelse med anfall hvor en samtidig kan gi god oppfølging og behandling av kompetent personell.
- Da intervju og prøver vil bli tatt i forbindelse med anfall/sykdom, vil reiseutgifter refunderes. Utgifter til konsultasjon vil ikke bli belastet i forbindelse med forskningsstudien. Dersom pasienter velger å sende blod via fastlege for mutasjonsundersøkelsen, vil utgifter til blodprøvetaking og forsendelse refunderes.

”Studie av areditært angioødem og andre bradykinutkløste angioødemer”. 1. februar 2011

Kapittel B - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Opplysninger som registreres om deg er opplysninger om anfallenes karakter, alvorlighetsgrad og hyppighet. Alle som får innsyn har taushetsplikt.

De genetiske analysene vil bli utført dels ved Oslo Universitetssykehus og dels i Frankrike av et laboratorium som har erfaring i analyser av de aktuelle genene. Det er nylig gjort tilsvarende undersøkelse av danske pasienter med areditært angioødem. Eventuelle prøver som sendes til utlandet vil ikke inneholde personopplysninger, kun prøvenummer.

Oslo Universitetssykehus ved administrerende direktør er databehandlingsansvarlig.

Biobank

Blodprøvene og eventuelt vevsprøvene som blir tatt og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Oslo Universitetssykehus. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Overlege Per Helsing ved Hudavdelingen ved Oslo Universitetssykehus er ansvarshavende for forskningsbiobanken. Biobanken planlegges å vare på ubestemt tid, men personopplysningene som knytter deg til prøvene vil bli fjernet når studien er ferdig, senest i år 2020. Biobanken vil da være anonymisert.

Utlevering av materiale og opplysninger til andre

Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til professor Christian Drouet i Grenoble (Frankrike), som vil utføre noen av de genetiske undersøkelsene for oss.

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og

”Studie av hereditært angioødem og andre bradykinutkløste angioødemer”. 1. februar 2011

opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Økonomi og Shire’s rolle

Prosjektet har fått oppstartmidler fra legemiddelfirmaet Shire som lager medikamentet Firazyr (godkjent for behandling av arvelig angioødem). Firmaet har ikke rett til innsyn i dataene som lagres, ei heller påvirker de hva som skal undersøkes eller hvordan data skal presenteres.

Vi vil underveis søke forskningsmidler fra andre kilder for å kunne gjennomføre studien og opprette biobanken.

Forsikring

Vi har ikke etablert egen forsikring for denne studien, da vi ikke ser at deltakelse påfører deltakere risiko.

Informasjon om utfallet av studien

Alle deltakere vil få personlig informasjon om resultater av studien via brev eller telefon.

”Studie av hereditært angioødem og andre bradykinutkløste angioødemer”. 1. februar 2011

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien og tillater at opplysninger om sykdommen deles med samarbeidende leger og forskere også i utlandet (kun aidentifiserte opplysninger: ikke navn, personnummer, adresse)

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Stedfortredende samtykke når berettiget, enten i tillegg til personen selv eller istedenfor

(Signert av nærstående, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

7.3 Vedlegg 3: REK-godkjenning



UNIVERSITETET I OSLO

DET MEDISINSKE FAKULTET

Linn Landrø
Oslo universitetssykehus HF, Rikshospitalet
Sognsvannsveien 20
0027 Oslo

Regional komité for medisinsk og helsefaglig
forskningsetikk sør-øst C (REK sør-øst C)
Postboks 1130 Blindern
NO-0318 Oslo

Telefon: 22 84 46 67

Dato: 29.04.2011

Deres ref.:

Vår ref.: 2011/824 (oppgis ved henvendelse)

E-post: post@helseforskning.etikkom.no

Nettadresse: <http://helseforskning.etikkom.no>

Bradykinin-utløste angioødemer

Vi viser til søknad mottatt til frist 22.03.2011 om forhåndsgodkjenning av ovennevnte forskningsprosjekt. Søknaden er blitt vurdert av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk i henhold til lov av 20. juni 2008 nr. 44, om medisinsk og helsefaglig forskning (helseforskningsloven) kapittel 3, med tilhørende forskrift om organisering av medisinsk og helsefaglig forskning av 1. juli 2009 nr 0955.

Prosjektleder: Landrø Linn
Forskningsansvarlig: Oslo universitetssykehus HF

Hereditært angioødem (HAE) er en autosomal dominant sykdom som gir anfallsvise hevelser i hud og slimhinner. I Norge kjenner man ca. 100 personer fra mellom 10 og 20 familier. Sykdommen skyldes funksjonell mangel på proteinet C1-inhibitor forårsaket av mutasjoner i C1-inhibitor genet SERPING 1. Resultatet av redusert C1-inhibitorfunksjon vil være økt mengde av vasoaktivt bradykinin, som medfører væskelekkasje i karsengen og potensielt livstruende ødem i luftveiene. Man planlegger nå å kartlegge norske mutasjoner i SERPING 1. Det finnes andre former for bradykininutløste angioødemer (AE). Avgrensningen mot histaminutløste AE er viktig for diagnostikk og behandling, og det er nå etablert en metode for måling av bradykinin-metabolitten BK1-5 ved farmakologisk institutt, men denne er ennå ikke validert i klinikken. Man vil validere denne metoden for klinisk bruk ved å ta prøver under anfall, og samtidig spare blod for mutasjonsanalyse av aktuelle kandidatgen.

Forskningsetisk vurdering

Komiteen legger til grunn for sin behandling av dette prosjektet at det ikke skal inkluderes barn som ikke allerede er diagnostisert med HAE i den vitenskapelige delen av prosjektet. Komiteen legger videre til grunn at det er avklart at prosjektet ikke faller inn under bestemmelsene i bioteknologiloven. Det bes om en tilbakemelding dersom så ikke er tilfelle.

Det vises til søknadens punkt 2.b – **Forskningsdata**, hvor det anføres: *Vi vil opprette en database med opplysninger om frekvens og alvorlighetsgrad av anfall.* Komiteen understreker at det kun er den delen av søknaden som er knyttet til det spesifikke forskningsprosjektet – validering av metoden for måling av bradykinin-metabolitten BK 1-5 – som er realitetsbehandlet her. REK har ikke mandat til å vurdere eller godkjenne opprettelsen av helseregistre, jf. helseforskningslovens § 2 annet ledd.

Dersom det er aktuelt å opprette et behandlings- eller kvalitetsregister for gruppen med HAE, bør søker derfor avklare alle forhold knyttet til opprettelse av et tematisk register med Datatilsynet.

Forskningsbiobank

Det søkes om å opprette en spesifikk forskningsbiobank med navn *BRAKUTAN* i prosjektet.

Ansvarshavende for forskningsbiobanken er Per Helsing. Forskningsansvarlig er Oslo Universitetssykehus.

Biobanken vil bestå av blod- og vevsprøver.

Biobanken planlegges å vare til 2020. Deretter skal materialet behandles i henhold til helseforskningslovens § 30.

Biologisk materiale og helseopplysninger vil utføres til utlandet i henhold til helseforskningslovens §§ 29 og 37. Deltakerne er orientert om dette i informasjonsskriv.

Informasjonsskriv og samtykkeerklæring

Komiteen ser at formålet med prosjektet delvis vil være å bedre oppfølgingsrutiner for personer med påvist HAE, men mener likevel at informasjonsskrivet er i overkant positivt. Eksempler på dette er setninger som *Sannsynligvis vil tilbudet for alle oppleves som bedre, da det opprettes eget poliklinisk tilbud med kontaktleger og sykepleier.* Det bes derfor om at prosjektgruppen gjennomgår skrevet, med tanke på å bruke et mer nøytralt språk.

Informasjonsskrivet inneholder lite informasjon om hva vevsprøven som potensielt vil tas skal benyttes til. Det bes om at dette presiseres.

Kontakttelefonnummeret som er oppgitt i skrevet ser ut til å være et sentralbordnummer. Det bes om at direktenummer enten til prosjektleder eller til den rette instans ved Hudavdelingen inkluderes i skrevet.

Ut fra dette setter komiteen følgende vilkår for prosjektet:

1. Opprettelse av helseregister må søkes Datatilsynet.
2. Informasjonsskriv revideres i tråd med det ovennevnte.

Vedtak:

Prosjektet godkjennes under forutsetning av at ovennevnte vilkår oppfylles.

Komiteen godkjenner opprettelse av forskningsbiobanken *BRAKUTAN*, i tråd med det som er angitt i prosjektsøknaden. Biobankregisteret vil bli underrettet ved kopi av dette brev.

I tillegg til vilkår som fremgår av dette vedtaket, er tillatelsen gitt under forutsetning av at prosjektet gjennomføres slik det er beskrevet i søknaden og protokollen, og de bestemmelser som følger av helseforskningsloven med forskrifter.

Tillatelsen gjelder til 31.12.2019. Overføring av helseopplysninger til opprettet helseregister fordrer godkjenning fra Datatilsynet. Prosjektet skal sende sluttmelding på eget skjema, jf. helseforskningsloven § 12, senest et halvt år etter prosjektslutt.

Komiteens avgjørelse var enstemmig.

Forskningsprosjektets data skal oppbevares forsvarlig, se personopplysningsforskriften kapittel 2, og Helsedirektoratets veileder for *Personvern og informasjonssikkerhet i forskningsprosjekter innenfor helse- og omsorgssektoren*:

http://www.helsedirektoratet.no/samspill/informasjonssikkerhet/norm_for_informasjonssikkerhet_i_helsesektoren_232354

Hvis forskningsbiobanken opphører, nedlegges eller overtas av andre, skal det søkes REK om tillatelse, jf. helseforskningsloven § 30.

Komiteens vedtak kan påklages til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag, jf. Forvaltningslovens § 28 flg. Eventuell klage sendes til REK sør-øst. Klagefristen er tre uker fra mottak av dette brevet.

Med vennlig hilsen

Berit Grøholt (sign.)
professor dr. med.
nestleder

Tor Even Svanes
seniorrådgiver

Kopi: Oslo universitetssykehus HF; oushfdlgodkjenning@ous-hf.no
Biobankregisteret v/ nina.hovland@fhi.no

Vi ber om at alle henvendelser sendes inn via vår saksportal:
<http://helseforskning.etikkom.no> eller på e-post til: post@helseforskning.etikkom.no. Vennligst oppgi vårt saksnummer/referansenummer i korrespondansen.